

**HELSINGIN YLIOPISTO**

**Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos**

**EKT-sarja 1910**

**Perimän vaikutus kirjolohen D<sub>3</sub>-vitamiinipitoisuuteen ja UHPLC-  
APCI-MS/MS-menetelmän kehittäminen kalan D<sub>3</sub>-  
vitamiinipitoisuuksien määrittämiseksi**

**Pro gradu -tutkielma**

**Sirpa Kaukonen**

**Helsinki 2019**

## Tiivistelmä

Tiedekunta Maatalous-metsätieteellinen	Laitos Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto
Tekijä Sirpa Kaukonen	
Työn nimi Perimän vaikutus kirjolohen D <sub>3</sub> -vitamiinipitoisuuteen ja UHPLC-APCI-MS/MS-menetelmän kehittäminen kalan D <sub>3</sub> -vitamiinipitoisuuksien määrittämiseksi	
Oppiaine Elintarvikekemia	
Työn laji Maisterin tutkielma	Aika Lokakuu 2019
Sivumäärä 72	
<p>D-vitamiini on välttämätön rasvaliukoinen vitamiini, jonka tärkeimpiä fysiologisia tehtäviä on muun muassa ylläpitää veren kalsiumpitoisuutta ja vaikuttaa luuston vahvuuteen. Pääasiassa D-vitamiinia saadaan auringon valon avulla, kun ihon 7-dehydrokolesterolia syntetisoidaan kolekalsiferoliksi (D<sub>3</sub>-vitamiiniksi). Lisäksi D-vitamiinia saadaan myös ravinnosta. Kolekalsiferolia esiintyy eläinkunnan tuotteissa kuten eri kalalajeissa ja kananmunan keltuaisessa ja toista yleisintä D-vitamiinimuotoa, ergokalsiferolia (D<sub>2</sub>-vitamiinia), esiintyy sienissä. D-vitamiinipitoisuudet elintarvikkeissa ovat kuitenkin erittäin pieniä, ja se luo haasteita D-vitamiinianalytiikalle. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli kehittää aiempia menetelmiä herkempi ja nopeampi tapa määrittää D<sub>3</sub>-vitamiinipitoisuuksia kaloista, kun yleisesti D-vitamiinianalytiikassa käytössä olevaan nestekromatografiaan yhdistetään massaspektrometri. Samalla tässä tutkimuksessa oli tarkoitus selvittää perimän vaikutusta kirjolohien vaihteleviin kolekalsiferolipitoisuuksiin.</p> <p>Tutkimus toteutettiin Luonnonvarakeskuksen (Luke) toimeksi antamana. Tutkittavana oli sekä saman perimän omaavia kirjolohia että verrokki kirjolohia, joiden perimässä oli vaihtelua. Menetelmässä käytettiin yleisesti D-vitamiinianalytiikassa käytössä olevia esikäsittelymenetelmiä: saippuointia, uuttoa ja kiinteäfaasiuuttoa. Tarkoituksena oli kehittää määrittämenetelmä kvadrupolilentoaika-massaspektrometrille, mutta koska herkkyys tällä laitteella ei riittänyt näin pienille pitoisuuksille, jatkettiin menetelmän kehitystä kolmoiskvadrupolimassa-analysaattorilla. Näin saatiin määritettyä kirjolohien kolekalsiferolipitoisuudet, kun käytössä oli APCI-ionisaatiolähde ja MRM-menetelmä massa-analysaattorin pilkkoutumisreaktioissa.</p> <p>Kolmoiskvadrupolille kehitetyllä määrittämenetelmällä saatiin erinomainen toistettavuus. Tutkittujen kirjolohien kolekalsiferolipitoisuus oli noin 3 µg/100 g, mikä vastaa muiden tutkimusten tulostasoa. Vaihtelua eri kirjolohiryhmien välillä ei huomattu, mutta koska näytemäärä jäi tutkimuksessa melko pieneksi, on vaikea tehdä varmaa johtopäätöstä siitä, ettei perimällä olisi vaikutusta kirjolohien D<sub>3</sub>-pitoisuuksiin. Vaikka kolekalsiferolipitoisuudet saatiin hyvin määritettyä kirjolohinäytteistä, on menetelmässä vielä kehitettävää. Isot vaihtelut rinnakkaisissa sekä matalat takaisinsaantoprosentit viittaavat siihen, että kirjolohi näytematriisina on erittäin haastava. Esikäsittelyn eri vaiheisiin ja erityisesti kiinteäfaasiuuttoon tulisi vielä kiinnittää huomiota, jotta varmistettaisiin D-vitamiiniyhdisteiden kunnollinen eluoitus ja näytteiden puhtaus niin, että näytemateriaalista tulevat häiriöt eivät vaikuttaisi määrittämiseen massaspektrometrillä.</p>	
Avainsanat kolekalsiferoli, ergokalsiferoli, kirjolohi, massaspektrometri	
Säilytyspaikka Helsingin Yliopiston digitaalinen arkisto, Helda	
Muita tietoja EKT-sarja	

## Abstract

Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Department Department of Food and Nutrition	
Author Sirpa Kaukonen			
Title Genotype effects on vitamin D <sub>3</sub> content in rainbow trout and its determination by UPLC-APCI-MS/MS -method			
Subject Food Chemistry			
Level M. Sc. Thesis	Month and year October 2019	Number of pages 72	
<p>Abstract</p> <p>Vitamin D is essential vitamin and it has many important roles in human body like maintaining calcium content in blood and affecting bone strength. The most important source for vitamin D is sun light since UV-light of the sun synthesizes 7-dehydrocholesterol in the skin to the active form of vitamin D, cholecalciferol (D<sub>3</sub>). Food is also a good source for vitamin D and you can get cholecalciferol from animal products like fish and egg yolk. Another important form of vitamin D is ergocalciferol and you can get it from mushrooms. However, vitamin D contents in foods are small which makes its quantification hard. The aim of this study was to develop a new more efficient method for determination of vitamin D<sub>3</sub> content in fish. When liquid chromatography is used with mass spectrometry there is good potential for better results. At the same time, the effects of genotype on rainbow trout's vitamin D<sub>3</sub> content were tested.</p> <p>Natural Resources Institute Finland (Luke) commissioned this study. There were two types of fish to study: rainbow trouts with the same genotype and rainbow trouts with varying genotype. Pretreatment for these samples included well-known steps in vitamin D analytics: saponification, extraction and solid phase extraction. For the quantification, we tried to use time-of-flight mass spectrometry at first but it did not work with complex fish matrix. In few other studies, they have used triple quadrupole mass analyzer to determine vitamin D content and that is what we started to use in this study as well.</p> <p>With this method, we were able to determine vitamin D<sub>3</sub> contents of rainbow trout with high sensitivity. The cholecalciferol content in these rainbow trouts are approximately 3 µg/100g which corresponded with other studies. There were no notable difference between different rainbow trout groups, but since the sample amount was quite small, strong conclusions can not be made about the effects of genotype on rainbow trout's vitamin D<sub>3</sub> content. Even though we were able to determine vitamin D contents in rainbow trout, the method needs more developing. Some of the parallel samples did not give similar results and the recovery test gave small percentages, which might mean that changes in the preparation methods, like solid phase extraction, are needed.</p>			
Key words cholecalciferol, ergocalciferol, rainbow trout, mass spectrometry			
Where deposited Helsingin Yliopiston digitaalinen arkisto, Helda			
Additional information  EKT-sarja			

## **Esipuhe**

Tämä tutkimus on tehty Helsingin yliopiston elintarvike- ja ravitsemustieteiden osastolla Luonnonvarakeskuksen toimeksi antamana. D-vitamiinipitoisuuksiin liittyvää tutkimustyötä on tehty jo pidempään, ja tämä työ on jatkumo tälle elintarvikkeiden D-vitamiinipitoisuuksien tutkimustyölle.

Esitän parhaat kiitokseni työni vastuuprofessori Vieno Piiroselle sekä työn toimeksiantajalle Luonnonvarakeskuksen johtavalle tutkijalle Pirjo Mattilalle. Kiitos asiantuntevista neuvoista sekä kärsivällisyydestä työn erilaisissa haastavissa vaiheissa. Erityisesti haluan kiittää ohjaajaani yliopistonlehtori Velimatti Ollilaista hänen erittäin isosta panoksestaan työni onnistumiselle sekä tärkeistä neuvoista ja opastuksesta.

Lisäksi haluan kiittää farmasian tiedekunnan professoria Tapio Kotiahhoa, että pääsin saattamaan tutkimukseni loppuun Farmasian tiedekunnan kolmoiskvadrupoli massa-analysaattorilla. Sekä erityiskiitos Farmasian tiedekunnan laboratorioanalyttikko Riikka-Juulia Lepistölle korvaamattomasta teknisestä avusta näytteiden analyysivaiheessa.

Lopuksi haluan kiittää perhettäni antamastaan tuesta. Äitini Aila, isäni Timo ja siskoni Saila ovat aina kannustaneet ja auttaneet minua opiskelujeni aikana. Haluan myös kiittää kaikki ystäviäni ja opiskelukavereitani, joiden tuki on ollut korvaamatonta tämän tutkimuksen aikana.

Helsingissä 2019

Sirpa Kaukonen

## Sisällysluettelo

<b>Tiivistelmä</b>	2
<b>Esipuhe</b>	4
<b>1 Johdanto</b>	7
<b>2 Kirjallisuuskatsaus</b>	9
2.1 D-vitamiiniyhdisteiden kemiaa	9
2.1.1 D-vitamiinin rakenne	9
2.1.2 Kemialliset ja fysikaaliset ominaisuudet	11
2.2 D-vitamiiniyhdisteiden biosynteesi	12
2.2.1 D-vitamiinin muodostuminen	12
2.2.2 D-vitamiiniyhdisteiden biologinen aktiivisuus	13
2.3 D-vitamiinin saanti ja lähteet	14
2.3.1 D-vitamiini ravinnossa	14
2.3.2 D-vitamiini kalassa	16
2.4 D-vitamiinianalytiikkaa	17
2.4.1 Esikäsittely	18
2.4.2 Kaasukromatografiset menetelmät	21
2.4.3 Korkean erotuskyvyn nestekromatografiset menetelmät	22
2.4.4 Massaspektrometria	24
<b>3 Kokeellinen tutkimus</b>	33
3.1 Tutkimuksen tavoitteet	33
3.2 Materiaalit	33
3.2.1 Näytemateriaalit	33
3.2.2 Laitteet ja välineet	34
3.2.3 Reagenssit ja liuottimet	35
3.3 Menetelmät	36
3.3.1 Näytteiden esikäsittely	36
3.3.2 Saippuointi	36
3.3.3 Uutto	37
3.3.4 Kiinteäfaasiuutto	38
3.3.5 Massaspektrometrinen menetelmän kehitys kolekalsiferolin ja ergokalsiferolin kvantitointiin	39
3.3.6 Kolekalsiferolin ja ergokalsiferolin kvantitointi massaspektrometrisesti kirjoihinäytteistä	41

3.3.7 Tulosten laskeminen	43
3.4 Tulokset	45
3.4.1 Standardit ja kalibrointi	45
3.4.2 Toteamis- ja määrittäysrajat	47
3.4.3 Kolekalsiferolipitoisuudet kirjolohissa	47
3.4.4 Toistettavuus ja päivien välinen vaihtelu	49
3.4.5 Saantokoe	50
3.4.6 Vertailumateriaalin tuloksia	51
3.5 Pohdinta	52
3.5.1 Menetelmän spesifisyys	52
3.5.2 Menetelmän kalibrointi ja lineaarisuus	52
3.5.3 Menetelmän herkkyys sekä toteamis- ja määrittäysrajat	53
3.5.4 Perimän vaikutus kirjolohien kolekalsiferolipitoisuuksiin	55
3.5.5 Menetelmän toistot ja toistettavuus	56
3.5.6 Saanto ja suhteelliset systemaattiset virheet	58
3.5.7 Vertailumateriaalin soveltuvuus	58
<b>4 Päätelmät</b>	59
<b>5 Sisällysluettelo</b>	62
Liite 1	67
Liite 2	68
Liite 3	69
Liite 4	70
Liite 5	71
Liite 6	72

## 1 Johdanto

D-vitamiini on välttämätön rasvaliukoinen vitamiini, ja sen tärkeimpiä fysiologisia tehtäviä on muun muassa ylläpitää veren kalsiumpitoisuutta ja vaikuttaa esimerkiksi luuston vahvuuteen (Bender 2003). D-vitamiinia saadaan auringon UVB-säteilyn avulla, kun ihon 7-dehydrokolesterolia syntetisoidaan kolekalsiferoliksi eli D<sub>3</sub>-vitamiiniksi. Tämä on D-vitamiinin tärkein lähde, mutta sitä saadaan myös ravinnosta. Kolekalsiferolia esiintyy eläinkunnan tuotteissa kuten eri kalalajeissa ja kananmunan keltuaisessa. Toista yleisintä D-vitamiinimuotoa, ergokalsiferolia (D<sub>2</sub>-vitamiinia), esiintyy sienissä.

D-vitamiinipitoisuudet ravinnossa ovat kuitenkin erittäin pieniä, ja niissä esiintyy myös paljon vaihtelua niin elintarvikkeiden välillä kuin sisälläkin. Erityisesti kirjolohen D-vitamiinipitoisuuksia on tutkittu paljon, mutta tarkasti ei tiedetä, mikä vaikuttaa kirjolohen kolekalsiferolin muodostumiseen ja sen pitoisuuksien vaihteluun (Pierens ja Fraser 2015). Mattilan ym. (1997) toimesta on jo tutkittu muun muassa ravinnon ja muiden ulkoisten tekijöiden vaikutusta kirjolohen D-vitamiinipitoisuuksiin, mutta suoraa selitystä tähän ei ole löydetty. On siis epäselvää, mikä aiheuttaa niin suuret vaihtelut kirjolohien kolekalsiferolipitoisuuksissa.

Pienet D-vitamiinipitoisuudet elintarvikkeissa luovat myös haasteita D-vitamiinianalytiikalle. Analyysimenetelmältä vaaditaan hyvin korkeaa herkkyyttä ja tarkkuutta. Viime vuosina elintarvikkeiden D-vitamiinipitoisuuksia on määritetty pääasiassa nestekromatografisin menetelmin. Ennen määritystä D-vitamiiniyhdisteet tulee saada erotettua rasvaisesta matriisista, puhdistettua ja konsentroitua, mikä luo esikäsittelystä melko työlään. Menetelmien kehittyessä on kehittynyt myös uusia tehokkaampia tapoja tutkia D-vitamiinipitoisuuksia. Kuitenkin näytteiden esikäsittely on edelleen melko aikaa vievää ja työlästä.

Kun on tutkittu verinäytteistä D-vitamiinipitoisuuksia, on viime vuosina saatu jo hyviä tuloksia aikaan, kun nestekromatografiin on yhdistetty massa-analysaattori. Samalla on saatu erotettua myös muita D-vitamiinijohdannaisia, joita ei nestekromatografisin menetelmin saa helposti erotettua. Massaspektrometrian käyttö elintarvikkeiden D-vitamiinianalytiikassa on kuitenkin vielä erittäin vähäistä, sillä näytematriisi luo omat haasteet esikäsittelyn lisäksi myös itse määrittämismenetelmälle.

Tässä tutkimuksessa oli tarkoituksena kehittää menetelmä kirjolohien D<sub>3</sub>-vitamiinipitoisuuksien määrittämiseen massaspektrometrisesti. Näin mahdollistettaisiin nopeampi ja tarkempi tapa määrittää D<sub>3</sub>-vitamiinipitoisuuksia elintarvikenäytteistä ja tulevaisuudessa saataisiin erotettua myös muita D-vitamiinijohdannaisia elintarvikenäytteistä. Lisäksi tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, onko perimällä vaikutusta kirjolohen vaihteleviin D<sub>3</sub>-vitamiinipitoisuuksiin. Tutkimuksessa vertailtiin nimittäin saman perimän omaavia kirjolohia verrokki kirjolohinäytteisiin, joiden perimässä oli vaihtelua.



## 2 Kirjallisuuskatsaus

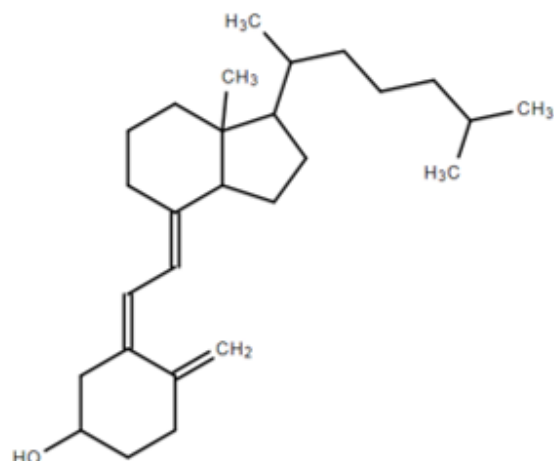
### 2.1 D-vitamiiniyhdisteiden kemiaa

D-vitamiinilla on riisitautia estävä vaikutus. D-vitamiiniyhdisteet löydettiin riisitautia ja sen parantamista tutkittaessa (Eitenmiller ym. 1944). Tärkeimpinä D-vitamiiniyhdisteinä pidetään ergokalsiferolia ( $D_2$ ) ja kolekalsiferolia ( $D_3$ ). Ergokalsiferoli muodostuu kasvisterolista nimeltä ergosteroli UVB-säteilyn avulla (Thompson ja Cressey 2014). Samaan tapaan kolekalsiferolia syntetisoidaan eläinkunnan kudoksissa 7-dehydrokolesterolista. Nämä ja monet muut näiden johdannaiset muodostavat ryhmän D-vitamiiniyhdisteitä, joiden kemialliset ja fysikaaliset ominaisuudet muistuttavat paljolti toisiaan.

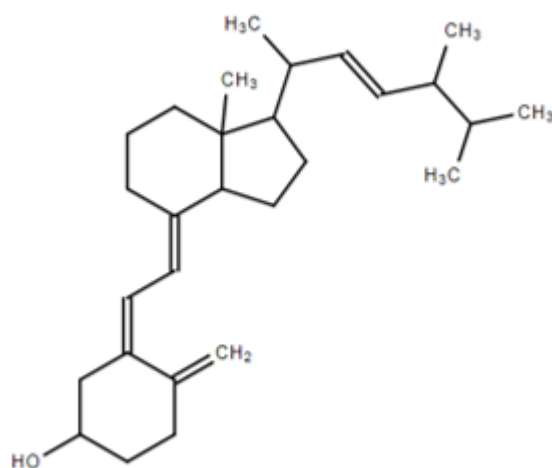
#### 2.1.1 D-vitamiinin rakenne

D-vitamiiniyhdisteet ovat ryhmä yhdisteitä, joilla on steroideille tyypillinen nelirenkainen rakenne (Gerald ja Combs 1992). D-vitamiiniyhdisteissä kuitenkin B-rengas on avautunut hiilien 9 ja 10 kohdalta, ja ehjät A-, C- ja D-renkaat yhdistää näin toisiinsa kaksoissidoksia sisältävä konjugoitunut trieenirakenne. Lisäksi D-vitamiiniyhdisteille ominaista on A-renkaaseen liittynyt hydroksyyliiryhmä sekä D-renkaan hiileen 17 kiinnittynyt sivuketju.

Perusrakenne kaikissa D-vitamiiniyhdisteissä on sama. Ne poikkeavat toisistaan pääasiassa sivuketjun rakenteiden kautta sekä hydroksyloituneiden muotojen osalta hydroksyyliiryhmien määrässä. Esimerkiksi kole- ja ergokalsiferoli eroavat rakenteellisesti toisistaan vain siten, että niiden C-17-sivuketjussa on ergokalsiferolilla kaksoissidos sekä yksi metyyliiryhmä enemmän (Kuva 1 ja 2).



**Kuva 1.** Kolekalsiferolin (D<sub>3</sub>-vitamiinin) rakenne



**Kuva 2.** Ergokalsiferolin (D<sub>2</sub>-vitamiinin) rakenne

Koska D-vitamiiniyhdisteissä A-rengas on niin sanotusti vapaana, se mahdollistaa vain D-vitamiiniyhdisteille ominaisen A-renkaan konformaatioliikkuvuuden, jolloin substituenttien asento pääsee vaihtelemaan (Miller ja Norman 1984). Lisäksi A-rengas sisältää D-vitamiiniyhdisteiden kiraaliset keskukset: kole- ja ergokalsiferolilla ne ovat C-3-hiilessä mutta muissa D-vitamiinijohdannaisissa niitä voi olla useampia.

Toinen vain D-vitamiiniyhdisteille ominainen rakenne on konjugoitunut trieenirakenne renkaiden välissä, joka vaikuttaa paljolti myös D-vitamiiniyhdisteiden fysikaalisiin ja kemiallisiin ominaisuuksiin (Miller ja Norman 1984). Ergo- ja kolekalsiferolien hiilien 5 ja 6 välinen kaksoissidos esiintyy luonnostaan cis-konfiguraatiossa. Tämä mahdollistaa korkeamman UV-B -säteilyn sitomisen mutta samalla altistaa nämä yhdisteet esimerkiksi hapettumiselle. Cis-konfiguraatio on siinäkin mielessä D-vitamiiniyhdisteille tärkeä, että vain tällä muodolla tiedetään olevan riisitautia estävää vaikutusta.

### 2.1.2 Kemialliset ja fysikaaliset ominaisuudet

D-vitamiini on olomuodoltaan valkoista tai kellertävää kiteistä jauhetta (Eitenmiller ym. 1944; Gerald ja Combs 1992). Se kuuluu rasvaliukoiseihin vitamiineihin yhdessä A-, E- ja K-vitamiinien kanssa. Näin ollen D-vitamiiniyhdisteet eivät liukene helposti veteen vaan ennemmin poolittomiin liuottimiin. Taulukossa 1 on esitetty tärkeimpien D-vitamiiniyhdisteiden kole- ja ergokalsiferolien ominaisuuksia.

**Taulukko 1.** Kole- ja ergokalsiferolin tärkeimpiä ominaisuuksia (Eitenmiller ym. 1944).

Yhdiste	moolimassa	liukenevuus	sulamispiste	UV absorbanssi
Kolekalsiferoli $C_{27}H_{44}O$	384,3	org liuottimet, ei vesi	84 - 85 °C	228 - 265 nm
Ergokalsiferoli $C_{27}H_{44}O$	396,3	org liuottimet, ei vesi	115 - 118 °C	228 - 265 nm

Muihin rasvaliukoisiin vitamiineihin nähden D-vitamiinia voidaan pitää hyvin stabiilina yhdisteenä (Eitenmiller ym. 1944; Gerald ja Combs 1992). Kuitenkin myös D-vitamiini on herkkä valolle sekä hapelle, ja hapettumista voi tapahtua esimerkiksi konjugoituneessa trieenirakenteessa renkaiden välissä. Lisäksi korkeat lämpötilat saattavat aiheuttaa D-vitamiiniyhdisteiden aktiivisten muotojen muuttumista inaktiivisiksi. Lämpötila aiheuttaa esimerkiksi kole- ja ergokalsiferolien isomerisoitumista takaisin niiden esimuodoiksi, joilla D-vitamiiniaktiivisuutta ei tiedetä olevan.

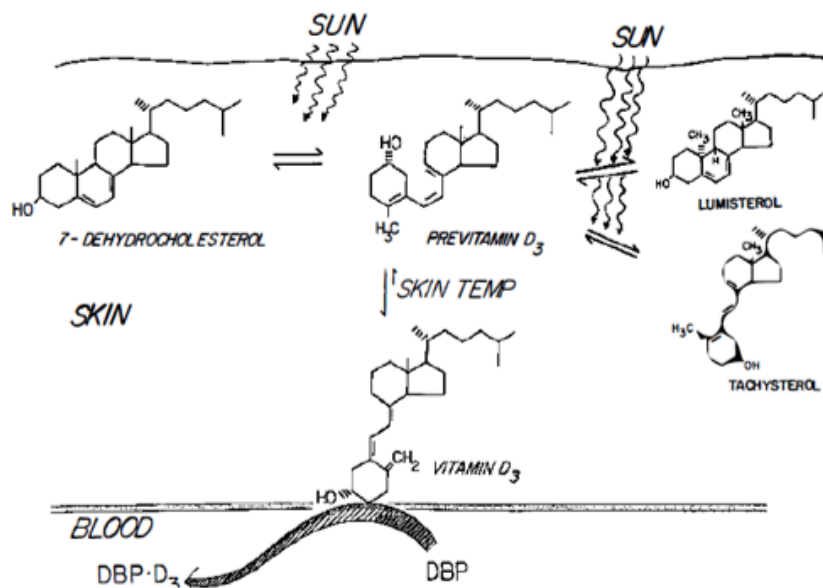
## 2.2 D-vitamiiniyhdisteiden biosynteesi

### 2.2.1 D-vitamiinin muodostuminen

D-vitamiinia syntetisoidaan auringon valon avulla ihon kudoksissa. Tärkein kolekalsiferolin lähde ihmiselle onkin auringon valo ja sen avulla tapahtuva kolekalsiferolin biosynteesi.

Kun iho altistuu auringon UV-valolle aallonpituusalueella 290-315 nm, se absorboituu ihon nelirenkaisen steroidin 7-dehydrokolesterolin dieenirakenteeseen. (Webb ja Holick 1988). Näin tämän prokolekalsiferolin B-rengas aukeaa ja syntyy prekolekalsiferolia, jolla on D-vitamiiniyhdisteille tyypillinen avoin rakenne sekä kaksoissidos hiilien 6 ja 7 välissä. Lämmön vaikutuksesta kaksoissidos siirtyy jälleen hiilien 5 ja 6 välille, ja syntyy termodynaamisesti stabiilimpi kolekalsiferoli. Kuvassa 3 on tarkemmin esitetty tämä D-vitamiinin biosynteesi iholla.

Samalla tavalla muodostuu ergokalsiferolia sienissä (Webb ja Holick 1988). Sienien ergosteroli (proergokalsiferoli) hajoaa pre-ergokalsiferoliksi UVB-säteilyn ansiosta ja muokkautuu siitä vielä ergokalsiferoliksi lämmön avulla.



**Kuva 3.** Kolekalsiferolin muodostuminen iholla (Webb ja Holick 1988)

### 2.2.2 D-vitamiiniyhdisteiden biologinen aktiivisuus

Kole- ja ergokalsiferoli kulkeutuvat elimistössä verenkierron mukana maksaan, jossa ne muokkautuvat erilaisiksi johdannaisiksi (Holick 2003). Siellä syntyvät muun muassa metaboliitit 25-hydroksikolekalsiferoli ja 25-hydroksiergokalsiferoli, jotka ovat yleisimpiä verenkierrossa kiertäviä D-vitamiiniyhdisteitä. Verenkierrosta ne jatkavat matkaansa munuaisiin, jossa voi syntyä lisää erilaisia metaboliitteja kuten 1,25-dihydroksikolekalsiferoli ja 1,25-dihydroksiergokalsiferoli.

D-vitamiiniyhdisteisiin lasketaan siis kole- ja ergokalsiferolin lisäksi niiden pro- ja previtamiinimuodot sekä monia eri metaboliitteja. Kuitenkaan pro- ja previtamiineilla ei ole todettu riisitauteja estäviä vaikutuksia (Lock 2010). Kaikkein vaikutuskykyisimmät muodot ovat kole- ja ergokalsiferolin 25- ja 1,25-hydroksyloidut metaboliitit, sillä niiden biologiset aktiivisuudet ovat moninkertaiset kole- ja ergokalsiferoliin nähden.

## 2.3 D-vitamiinin saanti ja lähteet

### 2.3.1 D-vitamiini ravinnossa

Vaikka ihmiselimistö pystyy tuottamaan kolekalsiferolia ihon kudoksissa, tulee sitä saada myös ravinnosta. Erityisesti niissä maissa, jossa auringon valon UVB-säteily on rajallista esimerkiksi talviaikoina, on syytä kiinnittää erityistä huomiota D-vitamiinin saantiin ravinnon kautta. Näin vältetään mahdollisilta puutostiloilta ja sitä kautta terveyttä haittaavilta oireilta kuten esimerkiksi riisitaudilta ja osteomalasialta eli luun pehmenemistaudilta (Eitenmiller ym. 1944).

Elintarvikkeita, jotka sisältävät luonnostaan D-vitamiinia, on hyvin vähän (Eitenmiller ym. 1944; Gerald ja Combs 1992; Lambert-Allardt 2006). Ergokalsiferolia esiintyy pääasiassa sienissä ja homeissa. Tärkeimmät ergokalsiferolin lähteet ovatkin ruokasienet. Kolekalsiferolia taas esiintyy eläinkunnan tuotteissa ja suurimpia pitoisuuksia on eri kalalajeissa, kalanmaksaöljyssä ja kanan munan keltuaisessa. D-vitamiiniyhdisteitä esiintyy näissä elintarvikkeissa kuitenkin hyvin pieniä määriä, vaikka ne ovatkin parhaita luontaisia lähteitä D-vitamiinille. Esimerkiksi kirjolohen kolekalsiferolipitoisuus on 7,8 µg/100 g (Mattila 1995). Taulukkoon 2 on kerätty myös muiden eläinperäisten elintarvikkeiden kolekalsiferolipitoisuuksia.

Eri D-vitamiiniyhdisteet myös imeytvät eri tavoin ruoansulatuskanavassa, joten myös tällä on vaikutusta D-vitamiinin saantiin ravinnosta (Lambert-Allardt 2006). Esimerkiksi kolekalsiferoli imeytyy ergokalsiferolia paremmin. Lisäksi metaboliittien biologinen aktiivisuus on kolekalsiferolia suurempi, ja ravinnosta saatu kole- ja ergokalsiferoli muokataan elimistössä niiden johdannaisiksi.

**Taulukko 2.** Eri elintarvikkeiden kolekalsiferolipitoisuuksia (Lamberg-Allardt 2006)

Elintarvike	Kolekalsiferoli
	µg/100 g (tuorepaino)
Kananmuna	2,8
Keltuainen	7,8
Kirjolohi	7,8 (Mattila 1995)
Naudan maksa	0,8
Voi	0,3

Koska D-vitamiinipitoisuudet ovat luonnostaan hyvin pieniä, on monissa maissa D-vitamiinisaannin takaamiseksi lisätty D-vitamiinia eri elintarvikkeisiin (Lambert-Allardt 2006). Suomessa D-vitamiinia on lisätty esimerkiksi margariiniin ja erilaisiin nestemäisiin maitotuotteisiin, joita voidaan tästä syystä myös pitää hyvinä D-vitamiininlähteinä.

Ravitsemussuositusten mukaan D-vitamiinin saanti ravinnosta tulisi olla 10 µg/vrk aikuisilla (Suomen ravitsemussuositukset 2014). Riskiryhmille, kuten vanhuksille, D-vitamiinin ravitsemussuositukseksi on asetettu jopa 20 µg/vrk. Hyvällä ja monipuolisella, paljon D-vitamiinia sisältävällä ruokavaliolla, aikuisten on mahdollista saada nämä pitoisuudet ravinnosta. Kuitenkin suositellaan, että erityisesti riskiryhmät käyttävät D-vitamiinilisiä ainakin vuoden pimeimpinä aikoina tai jopa ympäri vuoden, jotta voidaan taata riittävä D-vitamiinin saanti.

### 2.3.2 D-vitamiini kalassa

Kalat ovat erinomainen luontainen lähde D-vitamiinille. Ne sisältävät muiden eläinperäisten elintarvikkeiden tavoin pääasiassa kolekalsiferolia (Holick 2003). Kuten ihminen myös kala pystyy tuottamaan kolekalsiferolia pintakudoksien 7-dehydrokolesterolista. Kuitenkin UVB-säteily ei pääse kovinkaan syvälle vesistöön, joten kalat altistuvat vain vähän UVB-valolle. Tästä syystä uskotaan, että pintakudoksissa UVB-säteilyn avulla muodostuvalla kolekalsiferolilla ei ole suurta vaikutusta kalojen D-vitamiinipitoisuuteen (Lock ym. 2010). Pierens ja Fraser (2015) kuitenkin tutkivat kirjolohien D-vitamiinin alkuperää ja saivat selville, että kaloilla on mahdollisesti kyky syntetisoida kolekalsiferolia myös näkyvällä valolla aallonpituusalueella 380-480 nm.

Lisäksi kalat saavat D-vitamiinia ravinnostaan. Pääasiassa niiden ravintoon kuuluvat kasvi- ja eläinplanktonit (Lock ym. 2010). Kasviplanktonit ovat rinnastettavissa kasvikunnan eliöihin ja ne sisältävät näin pääasiassa ergokalsiferolia. Ei ole täysin selvää, pystyvätkö kalat syntetisoimaan myös ravinnosta saamansa ergokalsiferolin kolekalsiferoliksi, sillä tutkittaessa kalojen D-vitamiinipitoisuuksia saadaan pääasiassa tuloksia vain kolekalsiferolista (Holick 2003).

Eläinplanktonin uskotaan kuitenkin olevan pääasiallinen kalojen kolekalsiferolin lähde (Lock ym. 2010). Kalat sitovat huomattavia määriä kolekalsiferolia maksaan sekä lihaskudoksiin. Tästä syystä kalat ovat yksi parhaimmista ravintolähteistä D-vitamiinille. D-vitamiinipitoisuuksissa on kuitenkin vaihtelevuutta eri kalalajien kesken, ja niistä on taulukoitu tuloksia taulukkoon 3. Tarkempia syitä sille, miksi D-vitamiinipitoisuudet kalalajien kesken ja myös niiden sisällä vaihtelevat todella paljon, ei ole saatu selville. Esimerkiksi Mattilan ym. (1997) tekemässä tutkimuksessa kalan painolla, iällä ja sukupuolella ei havaittu olevan suoraa vaikutusta kolekalsiferolipitoisuuksiin eri kalalajeissa.



**Taulukko 3.** Eri kalalajien D-vitamiinipitoisuuksia (Lambert-Allardt 2006)

Kalalaji	Kolekalsiferoli
	µg/100 g
Ankerias	25,6
Kuha	24,6
Silli	15,4
Lohi	12,4
Tonnikala	7,2
Turska	7,0

## 2.4 D-vitamiinianalytiikkaa

D-vitamiinianalytiikka on melko haastavaa, koska D-vitamiinia esiintyy hyvin pieninä määrinä elintarvikkeissa sekä kudoksissa (Adamec ym. 2011). Tämän takia analyysimenetelmältä vaaditaan hyvin korkeaa herkkyyttä ja tarkkuutta (Mattila 1995). Lisähaastetta D-vitamiinianalytiikassa luo myös se, että D-vitamiini varastoidaan ja muokataan elimistössä biologisesti aktiivisiksi hydroksimetaboliiteiksi, jotka taas voivat muokkautua vielä muiksi yhdisteiksi (Adamec 2011). Erilaisia tutkittavia D-vitamiiniyhdisteistä on siis paljon. Lisäksi erityisesti elintarvikeanalytiikassa D-vitamiiniyhdisteiden tutkimiseen luo haasteita myös itse ruokamatriisi, sillä D-vitamiiniyhdisteet tulee saada erotettua rasvaisesta materiaalista, puhdistettua ja konsentroitua ennen niiden määrittämistä (Thompson ja Cressey 2014).

Kole- ja ergokalsiferolia on jo pitkään erotettu korkean erotuskyvyn nestekromatografisesti (HPLC) ja detektoitu ultraviolettidetektorilla tai

diodirividetektorilla (DAD) (Thompson ja Cressey 2014). Kuitenkin parempaa herkkyyttä ja tarkkuutta on viime vuosina saatu erityisesti verinäytteiden analytiikassa, kun nestekromatografi on yhdistetty massaspektrometriin. Näin on mahdollistettu nopeampi ja tarkempi analyysimenetelmä sekä on saatu tutkittua myös muita D-vitamiiniyhdisteitä. Massaspektrometrian soveltamisesta elintarvikkeiden D-vitamiinianalytiikkaan on tehty suhteellisen vähän tutkimusta.

Kromatografisten ja massaspektrometrysten menetelmien lisäksi D-vitamiinia voidaan tutkia myös biologisin, biospesifin ja kemiallisin menetelmin, mutta ne eivät ole nykypäivänä enää niin yleisiä, kun tehokkaammat menetelmät ovat yleistyneet.

#### 2.4.1 Esikäsittely

Muun muassa Association of Official Analytical Chemists (AOAC) on validoinut monia kemiallisia menetelmiä D-vitamiinin määrittämiselle eri elintarvikkeista (Byrdwell ym. 2008; Thompson ja Cressey 2014). Näitä vertaillessa voidaan todeta, että D-vitamiinianalytiikassa käytetään esikäsittelyn osalta samanlaisia periaatteita. Kaikki menetelmät sisältävät neljä tärkeää vaihetta: hajottamisvaihe, uuttovaihe, puhdistusvaihe sekä itse kvantitointi. Menetelmät vaihtelevat vain sisäisen standardin, uuttoliuottimien sekä puhdistus- että kvantitointimenetelmien valintojen osalta.

##### Saippuointi

Yleisimmin käytetty esikäsittelyn ensimmäinen hajottamisvaihe on emäshydrolyysi eli saippuointi. Sen tarkoituksena on hajottaa suurin osa näyttemateriaalista (Thompson ja Cressey 2014) sekä hydrolysoida glyseridit ja muut lipidit (Phillips ym. 2008). D-vitamiiniyhdisteet

saattavat myös joskus olla esteröityneinä C-3-hiilestä rasvahappojen kanssa, joten emäshydrolyysi mahdollistaa myös näiden sidosten hajoamisen (Parrish ja Richter 1979).

Useimmiten saippuointi tehdään huoneenlämmössä yön yli, jotta vältetään vitamiinien hajoamiselta (Mattila 1995; Ostermeyer ja Schmidt 2006). Esikäsittelyn nopeuttamiseksi kuitenkin on mahdollista tehdä saippuointi nopeammin kuumemmassa lämpötilassa esimerkiksi 75 °C:n lämpötilassa 45 minuutin ajan (Jakobsen ym. 2004). Erityisesti näissä tapauksissa on hyvä käyttää antioksidantteja mukana saippuointiseoksessa, jotta voidaan estää mahdolliset oksidatiiviset reaktiot saippuoinnin aikana. Saippuoinnissa on useimmiten käytössä kaliumhydroksidiliuos tai jokin muu vahva emäs (Thompson ja Cressey 2014).

Määritettäessä D-vitamiinia sisäisen standardin menetelmällä valitaan ja lisätään sisäinen standardi usein heti esikäsittelyn alussa eli punnittaessa näyttemateriaalia saippuointia varten. Yleisimmin sisäisenä standardina on käytössä ergokalsiferoli, kun määritetään kolekalsiferolia, ja kolekalsiferoli, kun määritetään ergokalsiferolia, koska nämä yhdisteet esiintyvät harvoin samassa näyttemateriaalissa (Thompson ja Cressey 2014). Myös sterolit toimivat D-vitamiinianalytiikassa sisäisenä standardina ja esimerkiksi ergosterolia on käytetty Ostermeyerin ja Schmidtin tutkimuksessa (2006) sisäisenä standardina. Tärkeintä sisäisen standardin valinnassa on kuitenkin se, ettei sitä esiinny näytteessä luonnostaan ja että sen ominaisuudet ovat mahdollisimman samankaltaisia kuin tutkittavan analyytin.

### Uuttaminen

Saippuoinnin jälkeen seuraa uuttovaihe. Sen tarkoituksena on erottaa D-vitamiiniyhdisteet muusta näyttemateriaalista saippuoinnin jälkeen (Thompson ja Cressey 2014). Uutto tehdään pääasiassa perinteiseen

tapaan erotussuppilossa tai koeputkessa neste-nesteuuttona. Koska D-vitamiiniyhdisteet ovat poolittomiin liuottimiin liukenevia, tulee valita jokin pooliton orgaaninen liuotin tai seos uuttamista varten (Eitenmiller ym. 1944). Uuttoliuottimet vaihtelevat riippuen tutkimuksesta, mutta yleisesti on käytössä petrolieetteri-dietyylieetteri– seos (1:1) sekä heksaani ja heptaani (Mattila 1995; Jakobsen ym. 2004; Ostermeyer ja Schmidt 2006).

### Puhdistusmenetelmät

Uuton jälkeen D-vitamiiniyhdisteet tulee vielä erottaa muista yhdisteistä (Thompson ja Cressey 2014). Koska D-vitamiiniyhdisteet ovat rasvaliukoisia yhdisteitä, siirtyminen orgaanisiin liuottimiin vaatii vielä huolellista puhdistamista. Seassa saattaa olla vielä muita yhdisteitä, jotka tulee saada erotettua D-vitamiiniyhdisteistä ennen itse kvantitointia. Puhdistamiseen onkin käytetty monia erilaisia menetelmiä ja näitä voi olla käytössä useampia samassa tutkimuksessa, jotta taataan paras mahdollinen puhdistuminen. Nykyään eniten käytettyjä menetelmiä ovat kiinteäfaasiuutto eli SPE (Solid-Phase Extraction) sekä preparatiivinen korkean erotuskyvyn nestekromatografia (Preparative High Performance Liquid Chromatography, preparatiivinen HPLC)

SPE:ssä käytetään useimmiten suoraafaasiuuttoa, jossa uute on liuotettuna poolittomaan liuottimeen kuten heksaaniin ja se siirretään piihappogeelipylvääseen (Mattila 1995). Näin D-vitamiiniyhdisteissä olevat hydroksyyli-ryhmät kiinnittyvät piihappogeelin poolisiin osiin. Pesu-vaihe tehdään poolittomilla liuottimilla kuten heptaanilla, jolloin muut yhdisteet saadaan poistettua. Lopuksi liuottimen poolisuutta lisäämällä saadaan D-vitamiiniyhdisteet eluoitua pylväästä. Useita eri liuottimia on tässä mahdollista käyttää, mutta esimerkiksi dikloorimetaaniin ja 2-propanolin seoksella saivat Cohen ja Wakeford (1980) D-vitamiiniyhdisteet eluoitua.

Toinen yleisesti käytössä oleva puhdistusmenetelmä D-vitamiinianalytiikassa on semipreparatiivinen HPLC. Tässä menetelmässä kole- ja ergokalsiferoli sekä muut D-vitamiiniyhdisteet erotetaan toisistaan nestekromatografisesti keräämällä kolonnin läpi menneet fraktiot joko manuaalisesti tai automaattisesti (Mattila 1995). Kerätyt fraktiot haihdutetaan kuiviin ja liuotetaan näyte kvantitointiin sopivaan liuottimeen. Useimmiten kvantitointi tehdään tämän jälkeen käänteisfaasinestekromatografisesti, joten siksi semipreparatiivisessa menetelmässä käytetään pääasiassa normaalifaasikolonneja. Normaalifaasikromatografiassa kole- ja ergokalsiferoli eluoituvat samanaikaisesti yhtenä piikkinä, mikä on suuri etu puhdistusvaiheessa.

Näiden kahden yleisimmän puhdistusmenetelmän lisäksi on myös monia muita tapoja puhdistaa näytteitä D-vitamiinimääritystä varten. Näistä esimerkkeinä ovat sterolien saostaminen sekä avoinkolonnikromatografia (Mattila 1995). Jokainen näistä menetelmistä mahdollistaa D-vitamiinin puhdistamisen muista yhdisteistä, ja ilman näitä vaiheita D-vitamiiniyhdisteiden kvantitointia häiritsisi helposti muut yhdisteistä. Näiden puhdistusvaiheiden jälkeen D-vitamiiniyhdisteet on siis mahdollista määrittää näytteestä valitulla kvantiointimenetelmällä.

#### 2.4.2 Kaasukromatografiset menetelmät

Kaasukromatografia on hyvin yleinen määritysmenetelmä ja sitä on käytetty myös monien steroidien ja hormonien määrittämiseen (Malkin ja Trafford 1984). Koska D-vitamiiniyhdisteet ovat myös steroidisia yhdisteitä, kaasukromatografian käyttäminen määritysmenetelmänä D-vitamiiniyhdisteille on mahdollista. D-vitamiiniyhdisteet ovat kuitenkin melko huonosti haihtuvia yhdisteitä, joten erottamista varten kaasukromatografian uuni tulee lämmittää jopa 200-350 °C:n lämpötilaan, mikä aiheuttaa ei-toivottuja reaktioita D-vitamiiniyhdisteissä.

Kole- ja ergokalsiferolin 5,6-cis-kaksoissidoksessa tapahtuu kaasukromatografiassa termisiä syklistaatioreaktioita (Malkin ja Trafford 1984; Mattila 1995). Tämän seurauksena D-vitamiiniyhdisteiden ominainen avoin B-rengas sulkeutuu muodostaen pyro- ja isopyrorakenteita. Nämä rakenteet ovat hyvin epästabiileja ja aiheuttavat kaksoispiikkejä kaasukromatogrammiin, jolloin yhdisteiden erottaminen hankaloituu.

Tästä syystä kaasukromatografian käyttö D-vitamiinianalytiikassa ei ole kovin yleistä. Varsinkin nykyään, kun muut menetelmät ovat kehittyneet, käytetään kaasukromatografiaa entistä vähemmän D-vitamiiniyhdisteiden määrittämiseen.

#### 2.4.3 Korkean erotuskyvyn nestekromatografiset menetelmät

Tällä hetkellä varmasti yleisin tapa erottaa ja määrittää D-vitamiiniyhdisteitä on korkean erotuskyvyn nestekromatografia eli HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Käytössä on sekä normaali-että käänteisfaasimenetelmiä, mutta yleisemmin määrittämisvaiheessa on käytössä käänteisfaasisysteemi, koska tällä tavalla saadaan erotettua ergo- ja kolekalsiferoli toisistaan (Mattila 1995).

#### Normaalifaasinestekromatografia

Normaalifaasinestekromatografiassa ergo- ja kolekalsiferoli voidaan erottaa muista D-vitamiiniyhdisteistä kuten niiden isomeereistä, previtamiinimuodoista sekä hydroksimetaboliiteista (Ball 1996). Kuitenkaan normaalifaasinestekromatografia ei pysty erottamaan ergo- ja kolekalsiferolia toisistaan, ja ne eluoituvat samaan aikaan. Ravitsemuksellisessa arvioinnissa tämä erottuminen ei ole aina välttämätön, joten näissä tapauksissa myös

normaalifaasinestekromatografia on potentiaalinen vaihtoehto D-vitamiinimääritykseen. Tällöin käytössä on pääasiassa ulkoisen standardin menetelmä sekä liikkuvana faasina n-heksaani yhdessä poolisemman eluentin kanssa (Mattila 1995).

### Käänteisfaasinestekromatografia

Käänteisfaasinestekromatografia mahdollistaa sisäisen standardin menetelmän käyttämisen, sillä se erottaa ergokalsiferolin ja kolekalsiferolin toisistaan ja näin niitä voi käyttää toisilleen sisäisinä standardeina (Ball 1996). Lisäksi tällä menetelmällä pystytään erottamaan myös näiden yhdisteiden previtamiinit, isomeerit sekä muut rasvaliukoiset vitamiinit (Mattila 1995). Tästä syystä käänteisfaasinestekromatografia on yleisesti käytössä oleva tapa D-vitamiinin erottamiselle ja määrittämiselle.

Käänteisfaasitekniikassa ajoliuoksena on poolinen liuotin ja kolonnimateriaalissa esimerkiksi sidottuja poolittomia ryhmiä (Ball 1996). D-vitamiinianalytiikassa käytössä on esimerkiksi metanolin, etanolin tai asetonitriilin vesiliuos liikkuvana faasina. Usein käytetty C18-kolonne sopii hyvin D-vitamiinin määrittämiseen.

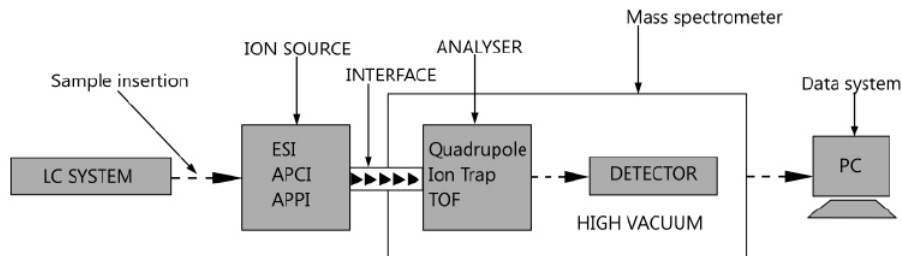
### Detektointi

Kun käytetään D-vitamiiniyhdisteiden määrittämiseen HPLC-menetelmiä, yleisimpiä detektoreja eli ilmaisimia ovat ultraviolett- ja diodirividetektorit (Thompson ja Cressey 2014). Pääasiassa D-vitamiiniyhdisteitä kvantitoidaan mittaamalla UV-absorbanssia välillä 250-265 nm sekä UV-detektorilla että joskus myös diodirividektektoinnilla. Näiden kahden yleisen detektointitavan rinnalle on viime vuosina saatu massaspektrometria, joka tuo aivan uusia mahdollisuuksia D-vitamiinianalytiikalle. Tätä kautta saadaan

haastavistakin näyttemateriaaleista pieniä D-vitamiinipitoisuuksia määritettyä sekä erotettua D-vitamiiniyhdisteitä laajemmin toisistaan.

#### 2.4.4 Massaspektrometria

Massaspektrometria on mittaustekniikka, jossa näyttemolekyylit ionisoidaan ja näin muodostuneet ionisoituneet molekyylit voidaan erottaa toisistaan massan ja varauksen suhteen (mass-to-charge,  $m/z$ ). Näitä  $m/z$ -arvoja ja niiden intensiteettejä mittaamalla voidaan määrittää näyttemolekyylien pitoisuuksia (Ketola ym. 2012). Massaspektrometriassa on kehittynyt useita erilaisia tapoja toteuttaa analyysi, mutta pääperiaate kaikissa näissä menetelmissä on sama (Kuva 4). Erilaiset vaihtoehdot kuitenkin mahdollistavat massaspektrometrian käytön monissa erilaisissa tutkimuksissa.



**Kuva 4.** Massaspektrometrilaitteiston kaavakuva (Duavi ym. 2017)

#### Näytteenotto

Näytteenottoon massaspektrometrille on monia eri tapoja, joista suorasyöttö on varmasti yksinkertaisin. Kuitenkin monimutkaisempien matriisien kuten D-vitamiiniyhdisteiden määrittämisen helpottamiseksi usein yhdistetään useampi erilainen erotusmenetelmä (Hoffmann ja Stroobant 2001). Näissä tapauksissa massaspektrometri toimii määrittävänä menetelmänä ja siihen yhdistetään jokin yhdisteiden erottelumenetelmä kuten kaasu- tai nestekromatografia. Näin yhdisteet



tulevat massaspektrometrille analysoitavaksi yksi kerrallaan. Tämä mahdollistaa korkeimman mahdollisen herkkyuden ja selektiivisyyden sekä varmistaa haluttujen yhdisteiden detektoitumisen massaspektrometrillä.

### Ionisaatio

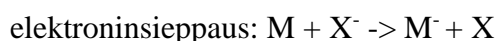
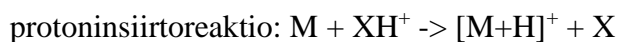
Molekyylit tulee ionisoida ionilähteessä ennen massa-analyysiä, koska massa-analysaattori erottelee vain ioneja toisistaan (Ketola ym. 2012). Ionityyppejä on useita, koska molekyyli voi ionisoitua usealla eri tavalla. Kun molekyyli luovuttaa tai vastaanottaa elektroneja, syntyy radikaalikationeja (+) tai radikaalianioneja (-). Lisäksi molekyyli voi myös vastaanottaa protonin tai muun adduktin, jolloin muodostuu protonoitunut molekyyli  $[M+H]^+$ . Ionisaatiossa molekyyli-ioneja voidaan pilkkoa vielä lisää ja syntyneitä hajoamistuotteita kutsutaan pilkeioneiksi (fragment ion).

Ionisaatiomenetelmiä on useita erilaisia, ja menetelmän valinta riippuu paljolti itse näytteen ominaisuuksista. Yksinkertaisimmillaan ionisaatio voidaan tehdä elektroni-ionisaatiolla (EI), jossa kaasumaisia näytemolekyylejä pommitetaan korkeaenergisillä esimerkiksi 70 eV:lla elektroneilla, jolloin yhdiste hajoaa elektroniksi ja radikaalikationiksi ( $M^{+•}$ ) (Ketola ym 2012). Tämä tapa sopii kuitenkin pääasiassa vain pienimolekyylisille poolittomille yhdisteille, ja se on eniten käytössä kaasukromatografia-massaspektrometriassa.

Kemiallista ionisaatiota (CI) pidetään monipuolisempana ionisaatiomenetelmänä kuin elektroni-ionisaatiota, koska siinä voi tapahtua useita erilaisia reaktioita muodostaen erilaisia molekyyli-ioneja (Ketola ym 2012). Kemiallisessa ionisaatiossa on myös mahdollista valita yhdisteelle sopiva ionisaatioreaktio ja näin ollen se on paljon

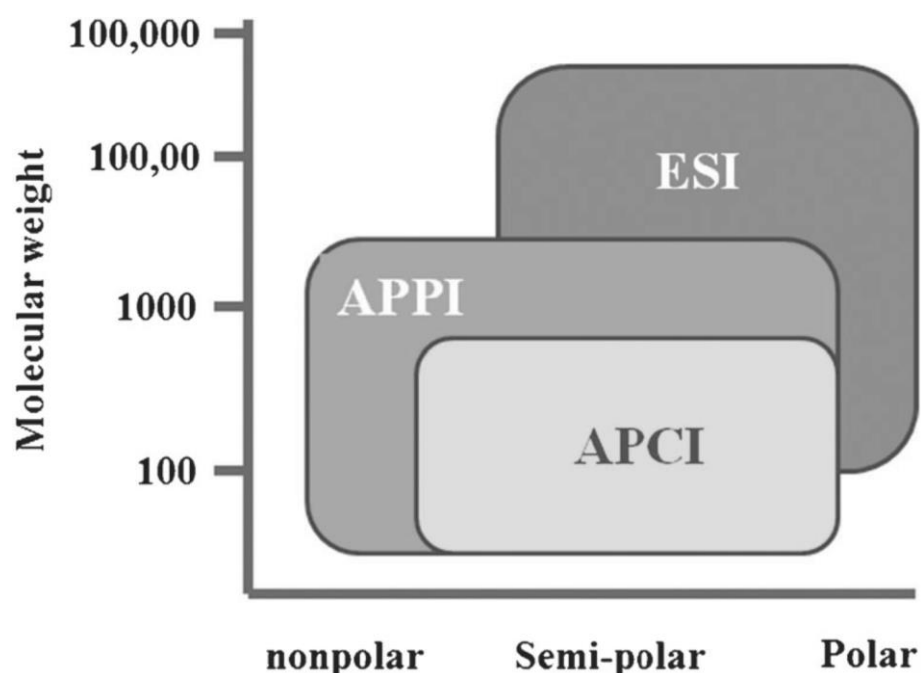
selektiivisempi. Lisäksi kemiallisessa ionisaatiossa käytössä olevan reaktanttikaasun valinnalla saadaan vain tietyt yhdisteet ionisoitua muiden jäädessä ionisoitumatta. Näin ollen eri reaktanttikaasuja käyttämällä voidaan kontrolloida pilkkoutumista.

Kemiallisessa ionisaatiossa tutkittava molekyyli reagoi siis reaktanttikaasusta muodostuneiden ionien kanssa (Ketola ym. 2012). Reaktanttikaasua johdetaan ionilähteeseen, jossa se ionisoituu muodostaen primaarisia ioneja  $R^{+\bullet}$ . Nämä primaariset ionit ja neutraalit reaktanttikaasumolekyylit törmäävät, minkä seurauksena syntyy sekundaarisia ioneja (kemiallisen ionisaation reaktantti-ioneja). Nämä sekundaariset ionit mahdollistavat kemiallisen ionisaation, sillä ne reagoivat näytteen kanssa. Kemialliselle ionisaatiolle tyypillisin ionisaatioreaktio on protoninsiirtoreaktio, jossa reaktantti-ionilta siirtyy protoni näytteelle (M). Lisäksi mahdollisia reaktioita ovat muun muassa varauksenvaihto sekä elektroninsieppaus.



Nestekromatografiin liitettyssä massaspektrometriassa ionisaatio tapahtuu pääasiassa ilmanpaineessa (Ketola ym. 2012). Tärkeimmät ja yleisimmin käytetyt ionisaatiotekniikat ovat sähkösumutusionisaatio ESI (electrospray ionisation), kemiallinen ionisaatio ilmanpaineessa APCI (atmospheric pressure chemical ionisation) sekä fotoionisaatio ilmanpaineessa APPI (atmospheric pressure photoionisation). Kuvassa 5 on esitetty yhdistetyypin mukaan, mihin eri ionisaatiomenetelmät soveltuvat parhaiten (Zhou ym. 2012). ESI soveltuu sekä pienille että suurille polaarille biomolekyyleille, mutta se ei välttämättä ole tarpeeksi tehokas neutraaleille ja poolittomille yhdisteille. APPI ja APCI

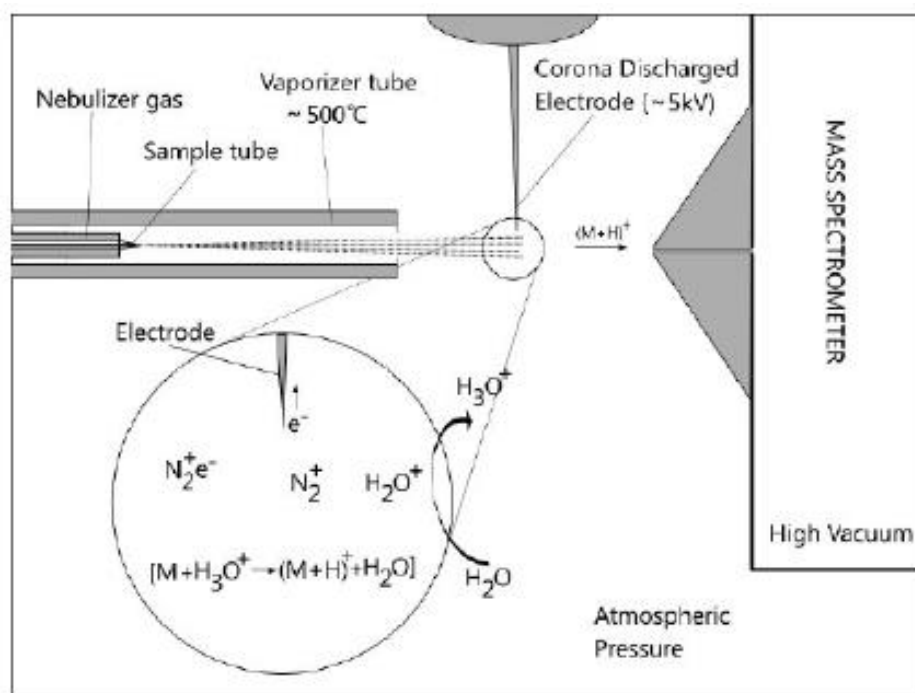
soveltuvatkin paremmin poolittomille yhdisteille sekä pienille ja melko stabiileille yhdisteille.



**Kuva 5.** Eri ionisaatiomenetelmien käyttöalueet poolisuuden ja molekyyliekoon mukaan (Zhou ym 2012)

D-vitamiiniyhdisteet ovat melko poolittomia yhdisteitä ja ne ovat rakenteeltaan pieniä, sillä kolekalsiferolin moolimassa on 384,3 Da ja ergokalsiferolin moolimassa on 396,3 Da (Eitenmiller ym. 1944). Tästä syystä voidaankin olettaa, että APCI ja APPI ovat potentiaalisimpia ionisaatiotekniikoita D-vitamiinianalytiikassa. Pääasiassa D-vitamiiniyhdisteitä massaspektrometrisesti tutkittaessa onkin käytetty juuri APCI-ionilähdettä (Phillips ym. 2008; Byrdwell 2009; Huang ym. 2009; Trenerry 2011; Byrdwell ym. 2013; Fernandez ym. 2017; Friz ym. 2017; Phillips ym. 2018). Adamec ym. (2011) taas käyttivät tutkimuksessaan APPI:a ionisaatiolähteen. Koska ESI on yleisin ionisaatiomenetelmä, on myös tutkimuksia, jossa tätä tekniikkaa on käytetty (Gill ym. 2015; Gill ja Indyk 2018; Zhang 2018). Kuitenkin näissä tapauksissa kole- ja ergokalsiferolista on pitänyt muodostaa johdoksia, mikä vaikeuttaa esikäsittelyä eikä kole- ja ergokalsiferolia ole näin saatu kunnolla analysoitua ESI-ionisaatiolähdettä käytettäessä.

Kemiallinen ionisaatio ilmanpaineessa eli APCI, on siis yleisesti LC-MS:ssä käytetty ionisaatiomenetelmä (Ketola ym. 2012) ja erityisesti D-vitamiinianalytiikassa sitä käytetään paljon. Tässä menetelmässä nestekromatografian läpi kulkenut eluentti ajetaan noin 250-500 °C:n lämpötilaan kuumennetun höyrystimen sisään, jossa se sumutuskaasun kuten typen avulla saadaan höyrystymään (Ketola ym. 2012). Höyrystymisen jälkeen kaasufaasissa olevia molekyylejä ionisoidaan varauksenpurkauselektrodilla, jossa on noin 5 kV:n jännite ja joka emittoi elektroneja. Tapahtuu kemiallinen ionisaatio, jossa ilman  $N_2$  ja  $O_2$  ionisoituvat primaarisiksi ioneiksi  $N_2^+$  ja  $O_2^+$ . Nämä vuorostaan reagoivat edelleen ilmankosteuden ansiosta läsnä olevien  $H_2O$ -molekyylien kanssa muodostaen reaktantti-ioneja. Näin myös tutkittava yhdiste ionisoituu esimerkiksi protoninsiirtoreaktiolla, jos tutkittavan yhdisteen protoniaffiniteetti on suurempi kuin muodostuvien reaktanttimolekyylien. Kuvassa 6 on tarkemmin esitetty APCI:n toiminta periaate.

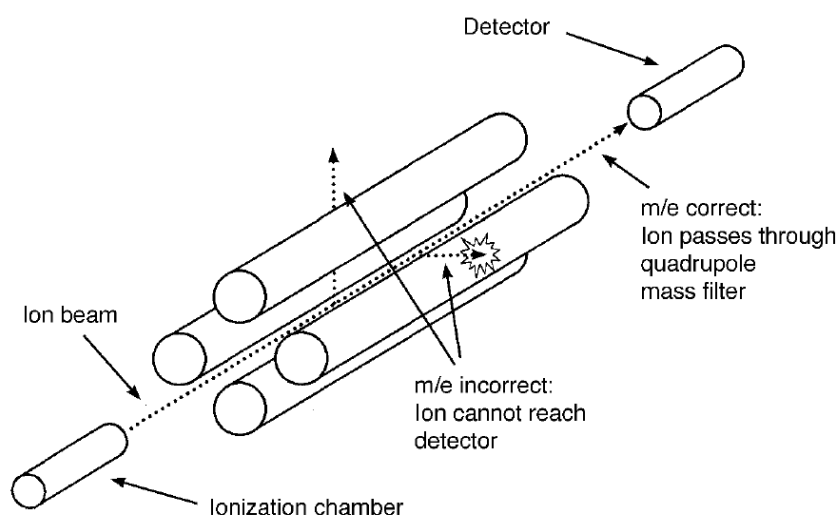


**Kuva 6.** Kemiallisen ionisaation ilmapaineessa toimintamekanismi (Duavi ym. 2017)

## Massa-analysaattorit

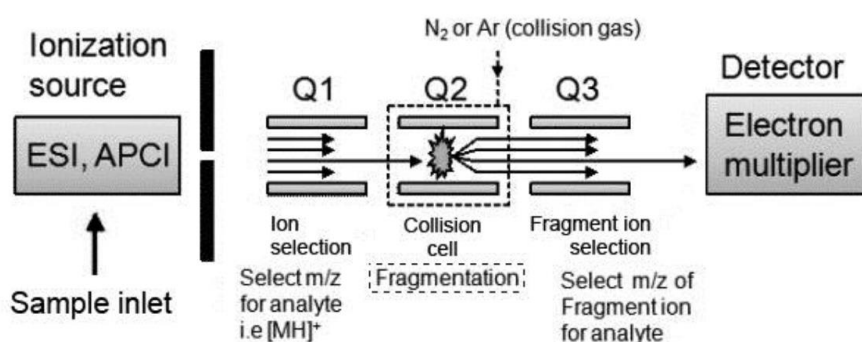
Ionisoituneet molekyyli-ionit johdetaan vakuuissa olevaan massa-analysaattoriin, jossa ne erotellaan niiden  $m/z$ -arvojen perusteella (Ketola ym. 2012). Alun perin massa-analysaattorit olivat sektorilaitteita, jossa ionien erottelu tapahtuu magneetti- ja sähkökentän avulla. Kuitenkin tekniikoiden ovat kehittyneet ja nykyään on monia erilaisia tapoja mitata molekyyli-ioneja.

Ehkä yleisimpiä massa-analysaattoreita ovat nykyisin kvadrupolianalysaattorit. Niissä ionit suodatetaan niiden  $m/z$ -arvojen suhteen, jolloin vain haluttuja ioneja pääsee läpi detektorille (Ketola ym. 2012). Kvadrupoli muodostuu neljästä yhdensuuntaisesta elektrodista, joihin on johdettu tietty jännite. Jännite saa aikaa sähkökentän, ja kun ioneja johdetaan kohti kvadrupolin sähkökenttää, ne alkavat värähtelemään. Värähtelyn laajuus riippuu elektrodien asetusta jännitteestä, joten jännitettä säätämällä pystytään vaikuttamaan ionien värähtelyyn ja siihen, mitkä ionit pääsevät kvadrupolin elektrodien sisään ja sitä kautta detektoreille ilman törmäyksiä elektrodien (Kuva 7).



**Kuva 7.** Kvadrupolianalysaattorin toimintaperiaate (Honour 2003)

Kun näitä kvadrupoleja kytketään peräkkäin, on mahdollista tutkia myös monimutkaisempia yhdisteitä tandemmassaspektrometrian avulla (MS/MS). Yleisimmiksi kvadrupoleja yhdistäväksi analysaattoriksi on muodostunut kolmoiskvadrupolit. Niissä useimmiten ensimmäinen ja kolmas kvadrupoli toimivat samalla tavoin. Niissä  $m/z$ -arvojen avulla suodatetaan haluttuja ioneja systeemissä eteenpäin (Ketola ym. 2012). Toiseen kvadrupoliin taas johdetaan törmäyskaasua, ja ionit voivat näin törmätä kaasumolekyyleihin ja hajota. Näin muodostuneet pilkeionit pääsevät kolmannen kvadrupoliin suodatuksen kautta detektoreille (Kuva 8).



**Kuva 8.** Kolmoiskvadrupolin toimintaperiaate (Faktor ym. 2012)

Kun on määritetty D-vitamiinipitoisuuksia elintarvikkeista massaspektrometrialla, on käytetty melkein pä pelkästään kolmoiskvadrupolianalysointoreita (Phillips ym. 2008; Byrdwell 2009; Huang ym. 2009; Byrdwell ym. 2013; Fernandez ym. 2017; Gill ja Indyk 2018; Phillips ym. 2018). Lisäksi verinäytteistä (Fritz ym. 2017) ja nestemäisiä maitonäytteistä (Trenerry 2011) on analysoitu D-vitamiinipitoisuuksia myös ioniloukkuanalysointorilla.

Geib ym. (2016) vertailivat kolmoiskvadrupolia lentoaikamassa-analysointoriin, joka on toinen hyvin yleinen analysointori massaspektrometriassa. Tässä ionit kiihdytetään tietyllä jännitteellä, ja erotetaan niiden nopeuksien perusteella (Ketola ym. 2012). Ionien  $m/z$ -arvot nimittäin määritetään siitä ajasta, joka ionilla kestää kulkea

detektorille. Geibin ym (2016) tutkimuksessa määritettiin veren seerumin D-vitamiinijohdannaisia näillä molemmilla yleisellä analysaattorilla, eikä selviä eroja havaittu. Kuitenkin haasteellisempia näyttemateriaaleja kuten kalaa on pääasiassa tutkittu kolmoiskvadrupolilla (Phillips ym. 2008; Byrdwell 2009; Byrdwell ym. 2013; Fernandez ym. 2017; Phillips ym. 2018). Lisäksi kolmoiskvadrupoilla pystytään tarkemmin varmistamaan vain tiettyjen ja haluttujen ionien analysointi kvadrupoli-systeemillä, mikä varmasti tekee analyysistä luotettavamman.

### Tandemmassaspektrometria

Tandemmassaspektrometriassa (MS/MS, MS<sup>n</sup>) pilkotaan ionilähteessä muodostuneita ioneja lisää, jolloin saadaan tarkempia tietoja ioneista (Ketola ym. 2012). Tässä tapauksessa massa-analyysivaiheita on siis useampia, kuten esimerkiksi kolmoiskvadrupolin toimintaperiaatteessa on jo esitetty.

Ensimmäisessä vaiheessa (Q1) näytteestä ionisaatiolla muodostuneista ioneista valitaan haluttu ioni eteenpäin seuraavaan vaiheeseen (Honour 2003). D-vitamiinianalytiikassa tämä ioni on usein protonoitunut kolekalsiferoli  $[M+H]^+$   $m/z$  385,3 Da ja protonoitunut ergokalsiferoli  $[M+H]^+$   $m/z$  397,3 Da (Phillips ym. 2008; Byrdwell 2009; Huang ym. 2009; Trenerry 2011; Byrdwell ym. 2013; Fernandez ym. 2017; Friz ym. 2017; Phillips ym. 2018). Seuraavassa vaiheessa (Q2) nämä valitut ionit törmäilevät törmäyskaasuun ja samalla pilkkoutuvat pilkeioneiksi (Honour 2003). Kaikki muodostuneet pilkeionit pääsevät kolmanteen vaiheeseen (Q3), josta vain valitut pilkeionit pääsevät detektorille analysoitavaksi. Näin mahdollisesta todella spesifinen tapa analysoida, ja varmistetaan tulosten luotettavuus.

Yleisimmin kole- ja ergokalsiferolia analysoitaessa tutkitaan veden lohkeamista eli kolekalsiferolin tapauksessa ionia  $[M+H-H_2O]^+$   $m/z$  367,3 Da ja ergokalsiferolin tapauksessa ionia  $[M+H-H_2O]^+$   $m/z$  379,3 Da (Phillips ym. 2008; Byrdwell 2009; Byrdwell ym. 2013). Tätä tapaa, jossa vain yksi pilkeioni on tarkkailussa, kutsutaan valitun reaktion tarkkailuksi (selected reaction monitoring, SRM). Kuitenkin menetelmän voi saada vieläkin tarkemmaksi, kun otetaan useampi pilkeioni tarkkailuun (multiple reaction monitoring, MRM). Siten voidaan varmistaa, että tutkitaan juuri oikeaa näyte-ionia niin sanotuilla varmistusioneilla (qualifier), kun kaikki halutut pilkkoutumisreaktiot tulee tapahtua ennen ionien detektointia. Myös tämä tapa on yleisesti käytössä D-vitamiinianalytiikassa, mutta veden lohkeaman lisäksi on hyvin vaihtelevia ioneja varmistuksena (Fernandez ym. 2017; Fritz ym. 2017).



### 3 Kokeellinen tutkimus

#### 3.1 Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimuksen tavoitteena oli kehittää aiempia menetelmiä herkempi ja nopeampi tapa määrittää kolekalsiferolipitoisuuksia kaloista, kun yleisesti D-vitamiinianalytiikassa käytössä olevaan nestekromatografiaan yhdistettiin massaspektrometri. Samalla tässä tutkimuksessa oli tarkoitus selvittää perimän vaikutusta kirjolohien vaihteleviin kolekalsiferolipitoisuuksiin vertaamalla saman perimän omaavien kirjolohien kolekalsiferolipitoisuuksia pitoisuuksiin verrokki-kirjolohissa, joiden perimässä oli vaihtelua.

#### 3.2 Materiaalit

##### 3.2.1 Näyttemateriaalit

Näytteenä oli kahdentyyppisiä Luonnonvarakeskuksen (Luke) kasvattamia kirjolohia, joista toinen ryhmä oli perimältään yhtenevä (King, MARTO-linjan täysnaaras) ja toinen ryhmä sisälsi perimältään vaihtelevia kirjolohia (Verrokki, MARTO-linjan täysnaaras). Kokeen alussa molempien ryhmien kalat olivat rokotettuja ja keskipainoltaan noin 400 g. Kalat kasvatettiin normaalin käytännön mukaan samoissa olosuhteissa samassa altaassa Luken Paraisten toimipisteessä noin 2,5 kg:n painoisiksi (kasvatusaika noin 5 kk). Ennen yhdistämistä King-ryhmän kaloilta leikattiin rasvaevä tunnistamista varten. Menetelmän kehittämisen alkuvaiheissa käytettiin myös vähittäismyymälästä ostettuja kirjolohia. Vertailumateriaalina oli käytössä CRM-122-margariinia, joka on sertifioitu referenssimateriaali kolekalsiferolille.

### 3.2.2 Laitteet ja välineet

Tutkimuksessa käytettiin alle listattuja laitteistoja.

Watersin erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografi-massaspektrometrilaitteisto,

UHPLC-APCI-MS/MS

- Watersin Acquity UPLC I-class kromatografi
- Watersin Acquity FTN automaattinen näytteensyöttäjä
- Watersin Acquity UPLC HSS t3 C18-1,8 µm -kolonni
- Watersin Xevo™ TQ S massaspektrometri
- Watersin Zspray APCI-ionilähde
- Watersin Synapt G2 kvadrupoli-lentoaikamassaspektrometri

SPE-puhdistuslaitteisto

- uuttoastia
- vesi-imu
- SPE-pylväät: Phenomenex Strata SI-1 Silika (55 µm, 70 Å) 500 mg/3 ml

Muut käytetyt laitteet ja välineet

- homogenisaattori: Retsch Grindomix
- vakuumipakkauslaite
- analyysivaaka: Precisa 180A
- magneettisekotin: VWR
- sentrifuugi: Sorvall Instruments, RC5C, GSA-roottori
- pyöröhaihdutin: Büchi R-144, B-480-vesihaude
- typpihaihdutin: Pierce

### 3.2.3 Reagenssit ja liuottimet

Tutkimuksessa oli käytössä monia eri reagensseja ja liuottimia, jotka on listattu alle.

L-askorbiinihappo: Sigma, Kiina

ergokalsiferoli: D<sub>2</sub>-vitamiini, Arcos Organics, Kiina

kolekalsiferoli: D<sub>3</sub>-vitamiini, Sigma, USA

puhdistettu Milli-Q -vesi

kaliumhydroksidi: Merck, Saksa

etanoli: Etax, AAS, Suomi

n-heksaani: HPLC,  $\geq 97.0$  %, Honeywell, Saksa

natriumkloridi: Merck, Tanska

heptaani: HPLC,  $\geq 99$  %, Sigma, UK

isopropanoli: HPLC,  $\geq 99.9$  %, Sigma, Israel

dikloorimetaani: HPLC,  $\geq 99.8$  %, Sigma, Israel

typpikaasu, N<sub>2</sub>

asetonitriili: LC-MS,  $\geq 99.9$  %, Honeywell, Saksa

muurahaishappo

BCR-referenssimateriaali, CRM-122 -margariini

### 3.3 Menetelmät

#### 3.3.1 Näytteiden esikäsittely

Kirjolohia oli yhteensä 60, joista 30:llä oli sama perimä (King-ryhmä) ja 30:llä perimässä oli vaihtelua (verrokkiryhmä). Kaikki nämä kirjoloheet fileoitiin, jokaisen kalan toisesta fileestä otettiin nahka pois ja fileen liha homogenoitiin ja pakastettiin Luonnonvarakeskuksessa Jokioisten laboratoriossa. Kolekalsiferolin määritysmenetelmää kehitettiin aluksi vähittäismyymälästä ostetuilla kirjolohifileillä, jotka homogenoitiin itse yliopiston tutkimuslaboratoriossa. Kun menetelmän kehittäminen oli valmis, lähetettiin Luonnonvarakeskuksesta 15 King- ja verrokkiryhmän kirjolohinäytettä yliopistolle analysoitavaksi, ja niistä analysoitiin lopulta 10 kappaletta kummastakin ryhmästä.

#### 3.3.2 Saippuointi

Saippuoinnissa käytettiin suoraan Luonnonvarakeskuksen saippuointimenetelmää pienille määrille kirjolohinäytettä. Homogenisoitua kirjolohinäytettä punnittiin tarkasti 2 g 50 ml:n säilöpulloihin. Jokaisesta kalanäytteestä punnittiin 2 rinnakkaista näytettä. Analyysissä käytettiin sisäisen standardin menetelmää, johon standardiaineeksi oli valittu ergokalsiferoli. Ergokalsiferolia pipetoitiin tässä vaiheessa näytteisiin tunnettu määrä (0,2 µg/200 µl etanolia). Lisäksi näytteisiin punnittiin 0,1 g askorbiinihappoa, joka toimi antioksidanttina.

Rasvan poistamiseksi näytteet saippuointiin suoralla emässaippuointimenetelmällä huoneenlämmössä. Säilöpulloihin lisättiin 2 ml puhdistettua Milli-Q vettä, 5 ml 50-prosenttista kaliumhydroksidin vesiliuosta sekä 10 ml etanolia. Näytteitä sekoitettiin voimakkaasti ja jätettiin yön yli magneettisekoittajalle sekoittumaan valolta suojattuna.

Vertailumateriaalina käytetystä margariinista tehtiin myös neljä näytettä. Sertifioidun vertailumateriaalin ohjeessa ohjeistettiin, että margariinia tulisi punnita vähintään 10 g, mutta jotta esikäsittely saatiin tehtyä mahdollisimman samalla tavalla kuin kirjolohille, punnittiin margariinia vain 5 g 100 ml:n säilöpulloihin. Tämä määrä margariinia sisältää noin neljä kertaa enemmän rasvaa kuin 2 g:n kirjolohinäytteet, minkä vuoksi saippuointiin käytettäviä reagensseja lisättiin myös nelinkertainen määrä. Eli tässä tapauksessa lisättiin 0,4 g askorbiinihappoa, 10 ml vettä, 20 ml 50-prosenttista kaliumhydroksidin vesiliuosta sekä 40 ml etanolia. Sisäistä standardia lisättiin myös enemmän, 0,6 µg.

### 3.3.3 Uutto

Saippuoinnin jälkeen kolekalsiferolin ja ergokalsiferolin sisältävä saippuimaton osa uutettiin neste-nesteuutolla. Myös uuttovaihe toteutettiin Luonnonvarakeskuksen ohjeiden mukaisesti, ja uuttoliuottimeksi valittiin näin heksaani. Heksaania lisättiin suoraan kirjolohinäytesäilöpulloihin 15 ml ja margariininäytepulloihin 30 ml, minkä jälkeen näytteitä sekoitettiin vielä 15 minuutin ajan magneettisekoittajalla. Kerrosten annettiin erottua, minkä jälkeen ylempi faasi siirrettiin 30 ml:n Kimax-koeputkeen. Uutto toistettiin vielä toiseen kertaan joko 15 ml:lla heksaania (kirjolohinäytteet) tai 30 ml:lla heksaania (margariininäytteet) ja 15 minuutin sekoituksella magneettisekoittajalla. Tämän jälkeen erottunut ylempi faasi siirrettiin jälleen samaan 30 ml:n Kimax-koeputkeen. Margariininäytteitä uutettaessa uutetta tuli sen verran enemmän, että se kerättiin kahteen Kimax-koeputkeen.

Kerätyt uutteen pestiin vielä 5-prosenttisella natriumkloridin vesiliuoksella, jotta välttyttiin emulsion muodostumiselta. Koeputkiin lisättiin 12 ml tätä 5-prosenttista NaCl-liuosta ja ravisteltiin näytteitä voimakkaasti. Erottumisen varmistamiseksi näytteet vielä sentrifugoitiin 20 minuutin ajan huoneenlämmössä 2000 rpm:n kierrosnopeudella.

Sentrifugoinnin jälkeen ylempi faasi siirrettiin 100 ml:n pyörökolveihin. Tässä vaiheessa jaetut margariiniuutteet yhdistettiin yhteen pyörökolviin. Uutteet haihdutettiin pyöröhaihduttimella kuivaksi 37 °C:ssa ja noin 200 mbar:n paineessa. Tämän jälkeen haihdutusjäännös liuotettiin 3 ml:aan heksaania ja liuos siirrettiin kvantitatiivisesti 10 ml:n Kimax-koeputkeen. Tämä haihdutettiin vielä typpellä kuivaksi, jonka jälkeen näytteet liuotettiin 1 ml:aan heksaania ja pakastettiin.

### 3.3.4 Kiinteäfaasiuutto

Heksaanissa olevat näyteuutteet puhdistettiin vielä SPE:llä. Sorbenttimateriaalina käytettiin 3 ml:n piihappogeelipylväitä (500 mg), sillä piihappogeeliä on pääsääntöisesti käytetty D-vitamiinianalytiikassa puhdistusvaiheessa. Uuton eri vaiheet on eritelty taulukkoon 4.

Pylväät kostutettiin ensin 5 ml:lla heptaania, minkä jälkeen näyteuutteet siirrettiin pylväisiin sekä lisättiin 2 ml uutteissa liuottimena ollutta heksaania. Pylväät pestiin ensin 3 ml:lla heptaania ja 3 ml:lla heptaani:isopropanoli -seosta (99,5:0,5). Tämän jälkeen eluoitiin kahteen kertaan heptaani:dikloorimetaani -seoksella (70:30) ja vielä kahteen kertaan heptaani:dikloorimetaani -seoksella (50:50). Lopulliset fraktiot saatiin eluoimalla dikloorimetaani:isopropanoli -seoksella (97:3). Nämä otettiin talteen koeputkeen ja pakastettiin jatkotutkimusta varten.

D-vitamiiniyhdisteiden eluoituminen varmistettiin menetelmän kehitysvaiheessa. Kiinteäfaasiuuttoa tehtiin sekä standardiliuoksille että kirjolohinäytteille. Keräämällä kaikki pesu- ja eluutiofraktiot voitiin massaspektrometrillä varmistaa, missä eluution vaiheessa halutut D-vitamiiniyhdisteet saatiin ulos pylvästä. Tätä kautta saatiin selville, että eluution 5. fraktiossa sekä ergokalsiferoli että kolekalsiferoli saatiin eristettyä pylvästä.

Taulukko 4. Kiinteäfaasiuuton vaiheet

Vaihe	Liutotin	Määrä
Tasapainotus	heptaani	5 ml
Näyte	heksaani	näyte + 2 ml
Pesu 1	heptaani	3 ml
Pesu 2	heptaani:isopropanoli (99,5:0,5)	3 ml
Eluutio 1	heptaani:dikloorimetaani (70:30)	3 ml
Eluutio 2	heptaani:dikloorimetaani (70:30)	3 ml
Eluutio 3	heptaani:dikloorimetaani (50:50)	3 ml
Eluutio 4	heptaani:dikloorimetaani (50:50)	3 ml
Eluutio 5	dikloorimetaani:isopropanoli (97:3)	3 ml

### 3.3.5 Massaspektrometrinen menetelmän kehitys kolekalsiferolin ja ergokalsiferolin kvantitointiin

Pakastettuja näytteitä säilytettiin useampi kuukausi pakastimessa (-80 °C) menetelmän kehityksessä ilmenneiden ongelmien vuoksi. Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osastolla oli käytössä Watersin Synapt G2-kvadrupolilentoaikamassaspektrometri (QTOF-MS) yhdistettynä UHPLC-laitteistoon. Sähkösumutus-ionisaatiolla D-vitamiiniyhdisteet ionisoituvat hyvin heikosti eikä näin saatu D-vitamiiniyhdisteitä analysoitua. Tästä syystä valikoitui myös muissa tutkimuksissa yleisimmin käytetty APCI-ionilähde käyttöön.

QTOF-analysaattorilla saatiin APCI-ionisaatiomenetelmällä erotettua kole- ja ergokalsiferoli etanoliin tehdyistä standardi-liuoksista hyvin melko pieniin pitoisuuksiin asti. Tässä menetelmässä tutkittiin kolekalsiferolin protonoitunutta muotoa  $[M+H]^+$   $m/z$  385,3 Da ja veden lohjetessa muodostuvaa pilkeionia  $[M+H-H_2O]^+$   $m/z$  367,3 Da sekä ergokalsiferolin protonoitunutta muotoa  $[M+H]^+$   $m/z$  397,3 Da ja veden lohjetessa muodostuvaa pilkeionia  $[M+H-H_2O]^+$   $m/z$  379,3 Da.

Näytteiden analysoinnissa ilmeni ongelmat QTOF-analysaattorilla. D-vitamiinipitoisuudet olivat näytteissä todella pieniä eikä herkkyys tällä laitteella riittänyt näytteiden kole- ja ergokalsiferolin analysointiin, kun mukana oli myös näytematriisin aiheuttamat lisähäiriöt analyysille. Epäonnistuneiden testien jälkeen päätettiin siirtyä kehittämään menetelmää farmasian tiedekuntaan, sillä siellä oli käytettävissä muissakin D-vitamiinitutkimuksissa käytetty kolmoiskvadrupolimassa-analysaattori.

Farmasian tiedekunnan Watersin Xevo™ TQ S -massaspektrometri oli yhdistettynä Watersin Acquity UPLC I-class -kromatografiaan. Laitteistoon kiinnitettiin jo aiemmin käytössä olleet osat eli APCI-ionilähde sekä Waters Acquity UPLC-kolonne HSS-C18-1,8  $\mu$ m. Systeemi tasapainotettiin ajoliuoksella, asetonitriilillä, jossa oli 0,1 % muurahaishappoa. Menetelmän kehitysvaiheessa 100 % asetonitriiliä injektointiin myös kolonnin läpi laitteistoon, jotta varmistettiin sen puhtaus. Kole- ja ergokalsiferolista oli valmistettu etanoliin standardien kantaliuokset, joiden pitoisuudet olivat 10  $\mu$ g/ml ja 1  $\mu$ g/ml kolekalsiferolia ja/tai ergokalsiferolia. Näitä standardiliuoksia injektoiden saatiin huomattavasti paremmin näkyviin kole- ja ergokalsiferolit kuin esimerkiksi Q-TOF:lla (Liitteet 1 ja 2). Tässäkin tapauksessa tutkittiin aluksi kole- ja ergokalsiferolin veden lohkeamisessa syntyviä ioneja ja saatiin hyvin pienetkin pitoisuudet vielä näkyviin (Liite 3 ja Liite 4). Samalla mitattiin kole- ja ergokalsiferolin massaspekttrit. Liitteessä 5 on esimerkkinä kolekalsiferolin massaspektrometri protonoituneen kolekalsiferolin hajoamistuotteista.



Massaspektrometriä apuna käyttäen valittiin veden lohkeamisessa syntyvän pilkeionin lisäksi sekä kole- että ergokalsiferolille määrittävä pilkeioni (qualifier) mukaan menetelmään. Kolekalsiferolille valikoitui määrittäväksi pilkeioniksi  $[M+H-C_8H_{14}O]^+$  m/z 259 Da ja ergokalsiferolille m/z 295,1 Da, joita oli aiemmin saatu näkyviin myös QTOF-analysaattorilla standardeista sekä käytetty kolekalsiferolin osalta esimerkiksi Trenerryn ym. (2011). Näin saatiin tehtyä sekä kole- että ergokalsiferolin määrittämiselle MRM-menetelmä (multiple reaction monitoring, MRM), jossa molemmat pilkkoutumisreaktiot täytyy tapahtua ja näin valikoituneet ionit detektoidaan. Liitteessä 6 on esitetty MRM-menetelmän kromatogrammit standardiliuokselle. Lisäksi menetelmän toimivuutta testattiin pienemmille kole- ja ergokalsiferolipitoisuuksille, jotta varmistettiin sen toimivuus myös näytteissä olleilla pitoisuustasoilla (Liite 7 ja 8).

### 3.3.6 Kolekalsiferolin ja ergokalsiferolin kvantitointi massaspektrometrisesti kirjolohinäytteistä

Ennen kole- ja ergokalsiferolin määrittystä pakastetut uutteen haihdutettiin kuiviin. Koeputken pohjalle jäi valkea, kiteinen jäännös, joka liuotettiin 200 µl:an etanolia. Kun kiinteä aines oli saatu liukenemaan sekoittamalla, siirrettiin näyte sisäputkellisiin näytekupkeihin kvantitointia varten. Margariininäytteet eivät lienneet niin hyvin etanoliin, ja näytteet jouduttiin suodattamaan näytekupkeihin siirtovaiheessa.

Samalla valmistettiin standardisuoraa varten standardiliuokset taulukon 5 mukaisesti kolekalsiferolin ja ergokalsiferolin kantaliuoksista. Kolekalsiferolin pitoisuus vaihteli standardeissa, ja ergokalsiferolia pipetoitiin kaikkiin standardeihin sama määrä kuten näytteissäkin, jotta standardisuoran tuloksien kautta voidaan suoraan laskea pitoisuudet kolekalsiferolille sisäisen standardin menetelmällä ottaen huomioon erilaiset vasteet kole- ja ergokalsiferolille menetelmässä.

Taulukko 5. Standardisuoraa varten valmistetut standardinäytteet.

Kolekalsiferoli	Ergokalsiferoli
pitoisuus µg/ml	pitoisuus µg/ml
5	0,5
2	0,5
1,5	0,5
1	0,5
0,5	0,5
0,2	0,5
0,1	0,5
0,05	0,5

Määrittämissä ensimmäisenä mitattiin standardisuora ja sitten itse näytteet. Sekä standardisuoraa että itse näytteitä näitä injektioitiin 0,5 µl. Näytteiden ajoajaksi valittiin 18 minuuttia. Lisäksi kaikkien näytteiden välissä ajettiin 100 % asetonitriliä, jotta saatiin mahdolliset epäpuhtaudet poistettua kolonnista ennen seuraavaa näytettä. Tarkemmat menetelmän parametrit on esitetty taulukossa 6.

Menetelmän toimivuuden varmistamiseksi standardiliuosta, jonka kolekalsiferolipitoisuus oli 0,5 µg/ml, injektioitiin useaan otteeseen päivän mittauksen aikana. Tämän lisäksi myös valittiin muutamia näytteitä, joita injektioitiin kahteen kertaan laitteen toistettavuuden varmistamiseksi. Ajopäivien välistä eroa tutkittiin analysoimalla samaa näytettä useampana päivänä. Lisäksi tehtiin saantokokeet kahdelle kirjolohelle punnitsemalla kaksi ylimääräistä rinnakkaista ja lisäämällä näihin 0,2 µg kolekalsiferolia punnitusvaiheessa. Lopuksi analysoitiin vertailumateriaalina käytetyt margariininäytteet.

Taulukko 6. Menetelmän ajo-olosuhteet

ajoliuos	asetonitrili + 0,1 % muurahaishappo
virtausnopeus	0,4
injektiovolumi	0,5 µl
ionisaatiolähde	APCI
polaarisuus	API+
varauksenpurkausneula	3,54 uA; 4 kV
ionilähde, lämpötila	150 °C
probe, lämpötila	450 °C
MS törmäysenergia	4
MS/MS törmäysenergia	20
Pilkkoutuminen, MRM	385,3>259,0 D <sub>3</sub> määrittävä pilkeioni 385,3>367,3 D <sub>3</sub> 397,3>295,1 D <sub>2</sub> määrittävä pilkeioni 397,3 >379,3 D <sub>2</sub>

### 3.3.7 Tulosten laskeminen

Tulokset laskettiin massa-analysaattorin MassLynx tietokoneohjelman Target Lynx laskentaohjelmalla. Ohjelmalla saatiin laskettua pitoisuudet ensin mikrogrammoina millilitraa kohden sisäisen standardin menetelmällä, minkä jälkeen otettiin huomioon laimennokset sekä näytteen massa. Näin saatiin laskettua rinnakkaisten kolekalsiferolipitoisuudet ja niiden keskiarvot sekä keskihajonnat. Tuloksia laskettaessa otettiin huomioon menetelmän erilainen vaste kolekalsiferolille kaavalla:

$$vaste = D3\ ala \times \frac{D2\ pitoisuus}{D2\ ala}$$

Tulosten keskiarvojen ja keskihajonnan lisäksi laskettiin sekä standardeille että kirjolohi- ja margariininäytteille variaatiokerroimet (CV%). Variaatiokerroin kertoo menetelmän toistettavuudesta eli miten paljon samoissa olosuhteissa mitatussa toistoissa on hajontaa. Se laskettiin alla olevalla kaavalla:

$$CV\% = \frac{\text{keskihajonta}}{\text{keskiarvo}} * 100$$

Yhdestä King-kirjolohesta ja yhdestä verrokkikirjolohinäytteestä tehtiin myös saantokoe. Molempien tavallisten näytteiden lisäksi tehtiin näistä myös kaksi rinnakkaista näytettä, joihin lisättiin sisäisen standardin lisäksi myös 0,2 µg kolekalsiferolia punnitusvaiheessa. Alkuperäistä näytettä vertaamalla näihin lisäyksen sisältäviin näytteisiin saatiin laskettua saantoprosentti alla olevalla kaavalla.

$$Saanto\% = \frac{\text{Lisäyksen sisältävä pit.} - \text{alkuperäinen pit.}}{\text{Lisäyksen pitoisuus}} * 100$$

Näiden lisäksi menetelmälle määritettiin myös toteamisraja (limit of detection, LOD) ja määritysraja (limit of quantitation, LOQ) standarditulosten avulla. Toteamisraja on se analyyttipitoisuus, joka saadaan erotettua taustasta. Määritysraja taas on pienin mahdollinen analyysipitoisuus, joka tällä menetelmällä voidaan luotettavasti määrittää. Näiden tulosten saamiseksi, laskettiin Excel laskentaohjelmalla keskivirhe vasteen ja laskennallisten pitoisuuksien suhteen standardeista. Standardisuorien yhtälöistä saatiin kulmakertoimet. Toteamis- ja määritysrajat laskettiin sitten alla olevien kaavojen mukaisesti:

$$LOD = \frac{\text{keskivirhe}}{\text{kulmakerroin}} * 3,3$$

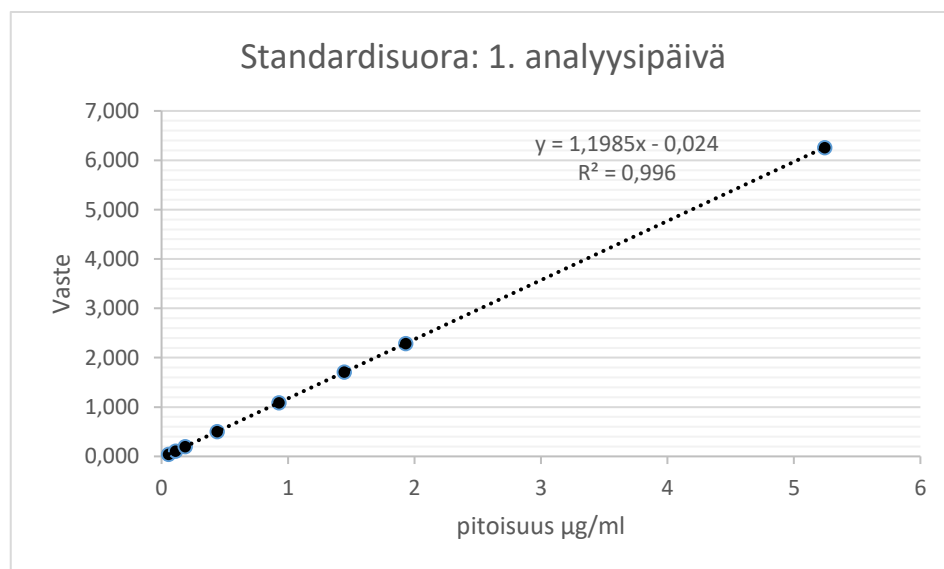
$$LOQ = \frac{\text{keskivirhe}}{\text{kulmakerroin}} * 10$$

### 3.4 Tulokset

#### 3.4.1 Standardit ja kalibrointi

Näytteitä analysoitiin kolmena päivänä ja jokaisella analyysikerralla määritettiin myös standardisuorat standardiliuoksilla. Taulukkoon 7 on kerätty kaikkien standardiajojen tulokset. Siihen on lueteltu kole- ja ergokalsiferolipitoisuudet standardeissa ja niistä lasketut vasteet sekä saadut retentioajat, pinta-alat sekä signaali-kohinasuhdearvot näille standardeille.

Vaste otettiin myös huomioon, kun laskettiin kolekalsiferolin pitoisuudet varmistamaan, että ne täsmäävät standardien tiedossa oleviin pitoisuuksiin. Lisäksi saatiin laskettua näiden laskennallisten tulosten keskihajonta (% Dev) tiedossa olevista pitoisuuksista.



Kuva 9. Ensimmäisen analyysipäivän standardiajojen standardisuora

Taulukko 7. Kolekalsiferolistandardien tulokset kaikilta kolmelta analyysipäivältä

Analyyysipäivä	Kolekalsiferolin (D3) pitoisuus, µg/ml	Kolekalsiferolin (D3) retentioaika	Kolekalsiferolin (D3) pinta-ala	Sis. Standardin (D2) pitoisuus, µg/ml	Sis. standardin (D2) retentioaika	Sis. Standardin (D2) pinta-ala	Vaste D3 ala*(D2 pit./D2 ala)	Kolekalsiferolin laskennallinen pitoisuus, µg/ml	%Dev	Signal to noise
18.12.2018	0,05	6,93	3867	0,5	6,56	42981	0,045	0,058	15,3	25,45
	0,1	6,88	9228	0,5	6,51	42047	0,110	0,112	11,7	68,72
	0,2	6,87	18239	0,5	6,51	45364	0,201	0,188	-6,1	57,15
	0,5	6,87	43228	0,5	6,51	42834	0,505	0,441	-11,8	145,25
	1	6,86	90754	0,5	6,5	41573	1,091	0,931	-6,9	666,41
	1,5	6,86	144567	0,5	6,5	42314	1,708	1,445	-3,6	1137,87
	2	6,86	197030	0,5	6,5	42999	2,291	1,932	-3,4	1115,12
	5	6,86	559537	0,5	6,5	44686	6,261	5,244	4,9	3336,14
20.12.2018	0,05	6,92	4821	0,5	6,56	48922	0,049	0,064	27,5	58,66
	0,1	6,86	9766	0,5	6,5	47968	0,102	0,106	6	61,55
	0,2	6,85	20268	0,5	6,49	50121	0,202	0,187	-6,7	189,40
	0,5	6,85	48551	0,5	6,49	47681	0,509	0,433	-13,3	760,37
	1	6,84	101633	0,5	6,48	46169	1,101	0,909	-9,1	446,64
	1,5	6,84	161565	0,5	6,48	46868	1,724	1,410	-6	572,88
	2	6,84	218374	0,5	6,49	46983	2,324	1,893	-5,4	2025,80
	5	6,84	632397	0,5	6,49	47741	6,623	5,349	7	5034,78
25.3.2019	0,05			0,5	6,44	22855				
	0,1	6,81	4181	0,5	6,44	23080	0,091	0,113	13	33681
	0,2	6,81	9747	0,5	6,45	22676	0,215	0,219	9,3	72584
	0,5	6,81	21348	0,5	6,44	21298	0,501	0,461	-7,7	169720
	1	6,8	44646	0,5	6,45	21731	1,027	0,908	-9,2	363754
	1,5	6,81	71817	0,5	6,45	22530	1,594	1,388	-7,4	583825
	2	6,81	100979	0,5	6,45	22627	2,231	1,929	-3,5	158343
	5	6,8	276986	0,5	6,45	22400	6,183	5,282	5,6	2257416

Ensimmäisen analyysipäivän standardisuora on esitetty kuvassa 9, jossa x-akselilla on standardien laskennalliset pitoisuudet ja y-akselilla vasteet. Standardisuoran yhtälöksi saatiin  $y=1,985x-0,024$  ja korrelaatiokertoimen neliöksi ( $r^2$ ) eli selitysasteeksi 0,996, mikä kertoo suoran hyvästä lineaarisuudesta. Samanlaiset standardisuorat saatiin myös toisena ja kolmantena analyysipäivänä. Toisen analyysipäivän standardisuoran yhtälöksi saatiin  $y=1,244x-0,03$  ja selitysasteeksi 0,993. Kolmantena analyysipäivänä standardisuoran yhtälö oli  $y=1,179x-0,043$  ja selitysaste oli 0,995.

### 3.4.2 Toteamis- ja määrittäysrajat

Standardien avulla saatiin määritettyä menetelmän toteamis- ja määrittäysrajat. Lasketut tulokset on kerätty taulukkoon 8. Menetelmän toteamis- sekä määrittäysrajat ovat erittäin pieniä pitoisuuksia (ng/ml). Menetelmä sopii siis hyvin myös kirjolohinäytteille, joissa pitoisuudet ovat näitä rajoja korkeampia (µg/ml).

Taulukko 8. Menetelmän toteamis- ja määrittäysrajat standardeille

Analyysipäivä	keskivirhe, ng/ml	kulmakerroin	Toteamisraja, LOD ng/ml	Määrittäysraja, LOQ ng/ml
1	0,036	0,024	4,96	15,04
2	0,036	0,03	3,99	12,09
3	0,027	0,043	2,09	6,33

### 3.4.3 Kolekalsiferolipitoisuudet kirjolohissa

Tutkimuksessa analysoitiin 10 saman perimän omaavaa kirjolohta eli Kingiä ja 10 Verrokkia, joilla perimässä oli vaihtelua. Jokaisesta kirjolohinäytteestä tehtiin kaksi rinnakkaista näytettä. UHPLC-APCI-

MS/MS-menetelmällä saadut tulokset on kirjattu taulukkoon 9. Lisäksi taulukossa näkyy Luonnonvarakeskuksen saadut tulokset samoille kirjolohinäytteille heidän omalla nestekromatografisella menetelmällään.

Taulukko 9. King-kirjolohinäytteiden (K1-K29) ja Verrokki-kirjolohien (V1-V27) analyysitulokset ja kolekalsiferolipitoisuudet rinnakkaismittausten keskiarvona

Kirjoloheen numero	Kolekalsiferolin (D3) pinta-ala	Sis. Standardin (D2) pinta-ala	Kolekalsiferoli-pitoisuus $\mu\text{g/ml}$	Kolekalsiferoli-pitoisuus $\mu\text{g/200}\mu\text{l}$	punnittu näytettä g	Kolekalsiferoli-pitoisuus $\mu\text{g/100g}$	rinnakkaisten keskiarvo $\mu\text{g/100g}$	LUKE tulos HPLC:llä $\mu\text{g/100g}$
K1	79930	35107	0,39	0,08	2,0906	3,73		
	59053	53197	0,20	0,04	2,0433	1,98	2,86	
K5	18916	19429	0,18	0,04	2,0955	1,75		
	49395	28066	0,31	0,06	2,0068	3,13	2,44	
K7	44856	16731	0,47	0,09	2,0944	4,46		
	35192	10833	0,56	0,11	2,0106	5,59	5,02	
K9	34770	7546	0,79	0,16	2,0190	7,82		
	42059	7470	0,96	0,19	2,0723	9,27	8,54	
K17	14589	39332	0,10	0,02	2,0735	0,96		
	58109	9598	1,06	0,21	2,0607	10,32	5,64	
K18	83538	41473	0,38	0,08	2,0223	3,74		
	52497	27940	0,36	0,07	2,0845	3,41	3,57	
K26	61423	39628	0,27	0,05	2,031	2,69		
	48862	47057	0,19	0,04	2,0652	1,85	2,27	3,3
K27	135198	66724	0,35	0,07	2,0284	3,45		
	246947	94226	0,45	0,09	2,0551	4,34	3,89	3,15
K28	125566	40348	0,52	0,10	2,0013	5,24		
	91655	72210	0,23	0,05	2,0161	2,26	3,75	5,25
K29	61195	31936	0,36	0,07	2,0249	3,57		
	42286	27226	0,30	0,06	2,0823	2,88	3,22	
V1	69429	26054	0,47	0,09	2,0739	4,48		
	551983	18667	0,51	0,10	2,0345	5,04	4,76	
V2	52591	19801	0,46	0,09	2,0718	4,47		
	64182	22908	0,34	0,07	2,0475	3,28	3,88	
V3	50017	27149	0,33	0,07	2,0520	3,20		
	42341	31603	0,24	0,05	2,0680	2,36	2,78	
V6	97164	51842	0,33	0,07	2,0857	3,19		
	93929	41689	0,40	0,08	2,0261	3,91	3,55	
V9	84058	32139	0,48	0,10	2,0019	4,80		
	82454	43143	0,36	0,07	2,0913	3,45	4,12	
V10	52682	41457	0,25	0,05	2,0155	2,50		
	50573	39291	0,25	0,05	2,0326	2,51	2,50	
V15	61459	24020	0,47	0,09	2,0916	4,50		
	61545	25224	0,45	0,09	2,0165	4,47	4,48	
V24	62801	23214	0,50	0,10	2,0508	4,83		
	71188	23113	0,56	0,11	2,0438	5,47	5,15	
V25	57195	29178	0,37	0,07	2,0329	3,63		
	53785	25848	0,39	0,08	2,093	3,72	3,67	
V27	50632	38067	0,24	0,05	2,0227	2,35		
	50094	25127	0,34	0,07	2,0436	3,37	2,86	2,45

King-kirjolohien kolekalsiferolipitoisuuden keskiarvoksi saatiin 4,12  $\mu\text{g/100 g}$  ja keskihajonnaksi 2,48  $\mu\text{g/100 g}$ . Verrokki kirjolohien keskiarvo oli 3,78  $\mu\text{g/100g}$  ja keskihajonta 0,95  $\mu\text{g/100g}$ . Nämä pitoisuudet vastaavat yleisesti kirjolohista saatuja kolekalsiferolipitoisuuksia.

Saatuja kolekalsiferolipitoisuuksia voitiin vertailla tilastollisesti t-testin avulla Excel-laskentaohjelmalla. Nollahypoteesiksi valittiin, että D3-



vitamiinipitoisuuksissa ryhmien välillä ei ole eroa. Vaihtoehtoinen hypoteesi oli näin ollen se, että ryhmien välillä D<sub>3</sub>-vitamiinipitoisuuksissa on eroa. Kahdensuuntainen t-testi sekä King-ryhmän että verrokkiryhmän kirjolohien kolekalsiferolipitoisuuksille (µg/100g) antoi p-arvon 0,62, joka on suurempi kuin 0,05 (5 %). Nollahypoteesi jäi siis voimaan, ja tilastollisesti voitiin todeta, että D<sub>3</sub>-vitamiinipitoisuuksissa ryhmien välillä ei ole eroa.

### 3.4.4 Toistettavuus ja päivien välinen vaihtelu

Menetelmän luotettavuutta mitattiin usealla eri tavalla kaikkina kolmena analyysipäivänä. Ensinnäkin standardia, jonka pitoisuus oli 0,5 µg/ml, injektointiin useita kertoja ajojen aikana. Tällä tavoin varmistettiin, että ajon aikana tulokset pysyivät mahdollisimman samana laskennallisen pitoisuuden kanssa. Taulukkoon 10 on kerätty näiden mittauksien tulokset.

Taulukko 10. 0,5 µg/ml kolekalsiferolia sisältävän standardin toistot ja niiden tulokset

Analyysipäivä ja näyte	Kolekalsiferolin (D3) pinta-ala	Sis. Standardin (D2) pinta-ala	Kolekalsiferoli- pitoisuus µg/ml	Pitoisuuksien keskiarvo µg/ml	Pitoisuuksien keskihajonta µg/ml	variaatiokerroin CV%
18.12.2018	43228	42834	0,441			
0,5 µg/ml D3 std	48110	46251	0,454			
	52005	49216	0,461	0,452	0,010	2,245
20.12.2018	48551	47681	0,433			
0,5 µg/ml D3 std	53182	50872	0,444			
	54501	53294	0,435	0,438	0,006	1,348
25.3.2019	21348	21298	0,461			
0,5 µg/ml D3 std	23188	22601	0,471			
	22496	21987	0,470			
	24373	24590	0,457	0,465	0,007	1,528

Myös muutamaa näytettä injektointiin kahteen kertaan, jotta voitiin varmistaa näin toistettavuutta myös näytteiden osalta. Tulokset on kerätty taulukkoon 11, ja niistä huomataan, että suurta vaihtelua ei rinnakkaisten injektioiden välillä ole.

Taulukko 11. Kahteen kertaan injektoitujen kirjolohinäytteen tulokset

Kirjolohe- numero	Kolekalsiferolin Sis. Standardin		Kolekalsiferoli- pitoisuus µg/ml	punnittu näytettä g	Kolekalsiferoli- pitoisuus µg/100g	Pitoisuuksien		Pitoisuuksien keskihajonta µg/ml	variaatiokerroin CV%
	(D3) pinta-ala	(D2) pinta-ala				rinnakkaisten keskiarvo µg/100g	rinnakkaisten keskihajonta µg/ml		
K18	52497	27940	0,355	2,0845	3,406				
	59479	27296	0,406	2,0845	3,894	3,65	0,345		9,460
K28	91655	72210	0,228	2,0161	2,264				
	94147	79202	0,215	2,0161	2,136	2,20	0,090		4,113
V1	551983	18667	0,513	2,0345	5,043				
	58018	19408	0,519	2,0345	5,102	5,072	0,042		0,822
V25	53785	25848	0,389	2,093	3,720				
	51470	28599	0,342	2,093	3,264	3,492	0,322		9,229

Päivien välistä vaihtelua eli sitä, miten samanlaisia tuloksia saatiin, kun olosuhteet muuttuvat eri päivinä, voitiin varmistaa sekä vertailemalla eri analyysipäivinä mitattujen standardien tuloksia (taulukko 10) että mittaamalla samaa näytettä useampana päivänä. Taulukossa 12 on tuloksia siitä, kun King-näytettä numero 7 mitattiin kahtena ensimmäisenä analyysipäivänä. Kolmas analyysipäivä oli sen verran myöhemmin, että tähän ajolistaan näytettä ei otettu enää mukaan.

Taulukko 12. Kahtena eri analyysipäivänä mitattujen King-kirjolohinäytteen tulokset tuorepainoa kohden.

Kirjolohe- numero	Kolekalsiferolin Sis. Standardin		Kolekalsiferoli- pitoisuus µg/ml	Kolekalsiferoli- pitoisuus µg/200µl	punnittu näytettä g	Kolekalsiferoli- pitoisuus µg/g	Kolekalsiferoli- pitoisuus µg/100g
	(D3) pinta-ala	(D2) pinta-ala					
K7	35192	10833	0,56	0,11	2,0106	0,056	5,59
K7	46177	13159	0,59	0,12	2,0106	0,06	5,85

Vaikka samaa näytettä pystyttiinkin mittaamaan vain kahtena päivänä, pystyttiin näistä tuloksista laskemaan myös keskiarvo ja keskihajonta. Keskiarvoksi saatiin 5,72 µg/100g ja keskihajonnaksi saatiin 0,185. Hajonta tulosten välillä ei ole suurta, mutta koska näytemäärä on niin pieni, ei variaatiokertoimen laskeminen ole perusteltua.

### 3.4.5 Saantokoe

Yhdestä King-kirjolohesta ja yhdestä verrokkikirjolohinäytteestä tehtiin myös saantokoe. Taulukkoon 13 on kerätty näiden kahden saantokokeen

tulokset, joista voidaan huomata, että saantoprosentit jäävät erittäin alhaisiksi. King-näytteellä se on 60,45 % ja Verrokki näytteellä 34,55 %. Nämä heikot saannot viittaisivat siihen, ettei kolekalsiferolin lisäys ole onnistunut tai että esikäsittelyn kautta kaikkea kolekalsiferolia ei ole eluoitunut mukaan lopulliseen näyteuutteeseen.

Taulukko 13. Kahden kirjolohinäytteen saantokokeiden tulokset

Kirjolohin numero	Kolekalsiferolin (D3) pinta-ala	Sis. Standardin (D2) pinta-ala	Kolekalsiferoli-pitoisuus $\mu\text{g/ml}$	Kolekalsiferoli-pitoisuus $\mu\text{g/200}\mu\text{l}$	Pitoisuuksien rinnakkaisten keskiarvo $\mu\text{g/200}\mu\text{l}$	Takaisinsanto%
K9	34770	7546	0,789	0,1578		
	42059	7470	0,96	0,192	0,1749	
K9 lisätty D3 0,2 $\mu\text{g}$	42022	7459	0,96	0,192		
	52539	4432	1,998	0,3996	0,2958	60,45
V6	97164	51842	0,333	0,0666		
	93929	41689	0,396	0,0792	0,0729	
V6 lisätty D3 0,2 $\mu\text{g}$	184917	49832	0,742	0,1484		
	138384	40831	0,678	0,1356	0,142	34,55

### 3.4.6 Vertailumateriaalin tuloksia

Sertifioituna vertailumateriaalina tässä tutkimuksessa käytettiin CRM-122-margariininäytettä, joka on Euroopan Unionin hyväksymä vertailunäyte. Margariininäytteitä tehtiin neljä, ja niitä esikäsiteltiin käytännössä samalla tavalla kuin kirjolohinäytteitäkin. Pieniä muutoksia jouduttiin tekemään isomman näytemäärän ja rasvapitoisuuden takia, ja tämä näkyi myös liukenemishaasteina loppuvaiheessa. Taulukkoon 14 on kerätty tulokset margariininäytteistä ja niiden kolekalsiferolipitoisuudet.

Taulukko 14. Margariininäytteiden analyysitulokset ja niiden kolekalsiferolipitoisuudet

Näyte	Kolekalsiferolin (D3) pinta-ala	Sis. Standardin (D2) pinta-ala	Kolekalsiferoli-pitoisuus $\mu\text{g/ml}$	Kolekalsiferoli-pitoisuus $\mu\text{g/200}\mu\text{l}$	punnittu näytettä g	Kolekalsiferoli-pitoisuus $\mu\text{g/g}$	Kolekalsiferoli-pitoisuus mg/kg
Margariini 1	26620	20408	0,700	0,140	5,0214	0,028	0,028
Margariini 2	48751	31733	0,818	0,164	5,0247	0,033	0,033
Margariini 3	71592	71868	0,543	0,109	5,0767	0,021	0,021
Margariini 4	72047	70086	0,560	0,112	5,0803	0,022	0,022

Kun laskettiin saatujen margariininäytteiden kolekalsiferolipitoisuuksien keskiarvo, saadaan tulokseksi 0,026 mg/kg. Keskihajonta taas oli 0,005. Vertailumateriaalin kolekalsiferolipitoisuudeksi on ilmoitettu  $0,125 \pm 0,007$  mg/kg. Saadut pitoisuudet ovat siis vain viidesosa ilmoitetusta

pitoisuudesta, mikä viittaisi siihen, että menetelmää tulisi vielä kehittää margariininäytteelle.

### 3.5 Pohdinta

#### 3.5.1 Menetelmän spesifisyys

Kole- ja ergokalsiferolien standardiliuokset olivat tärkeä osa menetelmän kehitystä. Niiden avulla saatiin aiempia tutkimuksia apuna käyttäen ja kokeilemalla kehitettyä menetelmälle sopivat ajo-olosuhteet sekä saatiin selvitettyä kole- ja ergokalsiferolille tapahtuvat pilkkoutumisreaktiot ja valikoitua menetelmässä käytettävät pilkeionit määrittämistä varten. Tämä mahdollisti kolekalsiferolille ja ergokalsiferolille spesifin menetelmän luomisen. Erityisesti MRM-tekniikalla tuotettu MS/MS-analyysi mahdollisti hyvän spesifisyyden. On nimittäin hyvin epätodennäköistä, että samalla retentioajalla eluoituisi muitakin yhdisteitä, joilla olisi nämä molemmat valikoidut pilkkoutumisreaktiot (Ketola ym. 2012). Taulukkoon 7 on kerätty kaikki standardinäytteiden retentioajat, jotka täsmäsivät hyvin toisiinsa, minkä avulla voidaan varmistaa, että halutut yhdisteet on analysoitu.

#### 3.5.2 Menetelmän kalibrointi ja lineaarisuus

Standardiliuoksista valmistetut standardinäytteet olivat tärkeä osa myös itse määrittämisvaihetta menetelmän toimivuuden varmistuksessa sekä kalibroinnissa. Kvantitointia varten tulee selvittää analyytin menetelmän vaste, joka kertoo analyytin tuottaman signaalin intensiteetin riippuvuudesta konsentraatioon (Ketola ym. 2012). Näin saadaan määritettyä luotettavasti tulokset myös itse näytteistä, ja varmistettua menetelmän lineaarisuus.

Koska käytössä oli sisäisen standardin menetelmä, myös kaikkiin standardinäytteisiin pipetoitiin sama määrä ergokalsiferolia (0,5 mg/ml). Standardinäytteiden ergokalsiferolin pinta-alojen tulisi näin kaikkien olla samaa luokkaa; tämä toteutui kaikkina kolmena analyysipäivänä erittäin hyvin. Myös kolekalsiferolin pinta-alat suurenivat tasaisesti standardipitoisuuksien mukaisesti. Vaste saatiin laskettua näiden pitoisuuksien suhteena, jolloin kolekalsiferolin ja ergokalsiferolin erilainen toimivuus menetelmässä otettiin huomioon, mikä lisäsi entisestään tulosten luotettavuutta.

Korrelaatiokerroin ja sen selitysasteet kertovat kalibroinnin onnistumisesta (Ketola ym. 2012). Kaikkien kolmen analyysipäivän selitysasteet ( $r^2$ -arvot) olivat korkeita, yli 0,99, mikä kertoi standardisuorien hyvästä lineaarisuudesta. Lasketut kolekalsiferolipitoisuudet vastasivat myös punnittuja standardipitoisuuksia ja keskihajonnat (Dev %) poikkeavat sekä yli että alle nollatason, mikä oli myös osoitus standardisuoran hyvästä lineaarisuudesta.

### 3.5.3 Menetelmän herkkyys sekä toteamis- ja määrittäysrajat

Signaalikohinasuhde -arvot (S/N) kertovat määritettävän yhdisteen vasteen ja taustakohinan suhteesta (Ketola ym. 2012). Nämä arvot standardisuoran näytteille on kerätty taulukkoon 7. Mitä suurempia S/N-arvoja saadaan, sitä herkempi menetelmä on kyseessä. Jo pienimmille standardipitoisuuksille S/N-arvot olivat yleisesti ottaen suuria, ja ne suurenivat hyvin pitoisuuden kasvaessa.

Kolmannen analyysipäivänä S/N-arvot olivat huomattavasti suurempia kuin muina päivinä. Tämä johtunee siitä, että UHPLC-APCI-MS/MS-laitteisto huollettiin perusteellisesti ja kalibroitiin uudelleen ennen kolmannen päivän analyysijä. Tällöin laitteeseen kerääntyneet

mahdolliset epäpuhtaudet ja vialliset osat oli vaihdettu, mikä pienensi myös taustaa itse analyysissä. Voidaankin siis todeta, että menetelmän herkkyys oli hyvä ensimmäisten analyysipäivien jälkeen ja erittäin hyvä näiden huollon jälkeen saatujen S/N-arvojen perusteella. Tällainen herkkyys mahdollistaisi varmasti vielä pienempienkin pitoisuuksien erottamiseen kuin mitä standardisuoraa varten oli analysoitu.

Menetelmälle tuleekin määrittää pienimmät mahdolliset pitoisuudet, joita voidaan luotettavasti määrittää. Tämä on liittyneenä S/N-arvoihin, sillä toteamisrajana pidetään sitä analyysin pitoisuutta, joka saadaan erotettua taustakohinasta. Määritysraja on korkeampi ja on usein se alin luotettava pitoisuus mitä voidaan tilastollisesti tietyllä todennäköisyydellä määrittää (Ketola ym 2012).

Tässä menetelmässä toteamis- ja määritysrajat olivat matalia, sillä ne olivat ng/ml -pitoisuuksia. Toteamisrajaksi kahdelle ensimmäiselle analyysipäivälle saatiin 4-5 ng/ml ja huollon jälkeen vieläkin pienemmäksi eli 2,1 ng/ml. Määritysrajat taas vaihtelivat pitoisuudesta 6 ng/ml pitoisuuteen 12-15 ng/ml. Nämä ovat erittäin pieniä pitoisuuksia, ja muilla detektointimenetelmillä tällaisiin pitoisuuksien ei ole mahdollista päästä. Kehitetyn menetelmän toteamis- ja määritysraja-arvot olivat samaa luokkaa kuin aiemmissa kolmoiskvadrupolilla tehdyissä tutkimuksissa. Kuitenkin esimerkiksi Zhang ym. (2018) pääsivät vieläkin pienempiin pitoisuuksiin, kun heidän tutkimuksessaan LOD oli 0,4 ng/ml ja LOQ 1,20 ng/ml.

Koska kolmoiskvadrupolilla päästiin hyvään herkkyyteen standardeilla, saatiin varmasti tästä syystä myös hankalammasta näytematriisista erotettua tasoa 0,5 µg/ml olevat pitoisuudet. QTOF-analysaattorilla ei saatu näin hyvään herkkyyttä edes standardeilla, mikä varmasti perustele sen, että itse näytteistä kolekalsiferolin määrittäminen oli lähes mahdotonta.

### 3.5.4 Perimän vaikutus kirjolohien kolekalsiferolipitoisuuksiin

Tutkimuksen yhtenä tavoitteena oli selvittää, vaikuttaako perimä kirjolohen lihaksen kolekalsiferolipitoisuuksiin. Tästä syystä taulukkoon 9 on eritelty King-näytteet, joilla on sama perimä, ja verrokkikirjoloheet, joiden perimässä on vaihtelua. Molemmissa ryhmissä näytteitä oli vain 10, joka on melko pieni määrä suurempien johtopäätösten tekemiselle. Kuitenkin näistä tuloksista voidaan saada hieman käsitystä kolekalsiferolipitoisuuksien vaihtelusta ja sen yhteydestä perimään.

King-näytteiden kolekalsiferolipitoisuuden keskiarvoksi saatiin 4,12  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  ja keskihajonnaksi 2,48  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , kun taas verrokkikirjolohien keskiarvo oli 3,78  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  ja keskihajonta 0,95  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . Molempien näyteryhmien kolekalsiferolipitoisuus oli siis keskimäärin samaa luokkaa. Myös t-testillä voitiin todistaa, että kolekalsiferolipitoisuuksissa ei ole ryhmien välillä tilastollista eroa. Kuitenkin tuloksissa vaihtelu on suurempaa King-näytteissä, mikä on hieman yllättävää, kun olisi voinut ajatella, että samanlaisen perimän omaavat kirjoloheet omaisivat myös hyvin samanlaisia kolekalsiferolipitoisuuksia. Näistä tuloksista voidaan päätellä, että perimällä ei ole vaikutusta kirjolohien kolekalsiferolipitoisuuksiin.

Kun tutkitaan taulukon 9 kolekalsiferolipitoisuuksia hieman tarkemmin, voidaan niissä huomata melko isoja poikkeamia. Esimerkiksi sisäisen standardin eli ergokalsiferolin pipetoitu määrä oli kaikille kirjolohinäytteille sama 0,2  $\mu\text{g}$ , mutta kuitenkin ergokalsiferolin mitatut pinta-alat vaihtelivat huomattavasti näytteissä. Näin ei ollut standardeissa, joten voidaan olettaa, että kyseessä on esikäsittelyssä tapahtuvat hajoamiset tai erityisesti näytematriisin aiheuttamat häiriöt sisäisen standardin määrittelykselle. Samalla voidaankin sitten miettiä, onko samanlainen vaikutus myös itse analyysiin eli kolekalsiferoliin. Ainakin rinnakkaisissa tuloksissa on myös paljon eroja, mikä johtuu luultavasti

juuri näistä ergokalsiferolin vaihtelevista pinta-aloista tai myös mahdollisesti tästä näytematriisin vaikutuksesta myös kolekalsiferolin määrittämiseen.

Mattila (1995) sai kirjolohen kolekalsiferolipitoisuudeksi 7,6 µg/ml. Suuruusluokaltaan saadut tulokset vastaavat, vaikka pitoisuudet ovatkin keskimäärän hieman pienempiä. Myös Luonnonvarakeskus määrittä itse osan samoista näytteistä omalla nestekromatografisella määrittämenetelmällään, ja nämä tulokset on myös kerätty taulukkoon 9 vertailun vuoksi. Vertaamalla Luken tuloksia massaspektrometrillä saatuihin tuloksiin saadaan samankaltaisia pitoisuuksia kirjolohinäytteille. Kolekalsiferolipitoisuudet ovat siis melko hyvin saatu määritettyä, mutta menetelmässä olisi vielä hieman kehitettävää, jotta rinnakkaiset ja sisäisen standardin pinta-alat eivät poikkeaisi niin paljoa toisistaan ja tulosten luotettavuutta voitaisiin näin vieläkin parantaa.

### 3.5.5 Menetelmän toistot ja toistettavuus

Toistettavuudesta kertoo kaikkina kolmena analyysipäivänä mitatut 0,5 µg/ml kolekalsiferolia sisältäneen standardinäytteen toistot päivien mittaan. Päivittäin nämä standardit pipetoitiin näytepulloihin ensimmäisenä analyysipäivänä valmistetusta kantaliuoksesta ja injektointiin aina tietyn väliajoin ajopäivän aikana. Vaikka kolmas analyysipäivä oli pitkän ajan päästä standardiliuoksen valmistuksesta, voitiin huomata, että kolekalsiferoli ei ollut hajonnut pitkäaikaissäilytyksessä pakastimessa, koska viimeisen analyysipäivän tulosten keskiarvo oli suurin, mikä viittaa vain hieman haihtuneeseen etanoliin.

Kirjolohinäytteistä saatuja massaspektrometrin pinta-aloja tarkastelemalla taulukosta 10 voidaan todeta, että tulokset pysyivät hyvin linjassa. Tästä syystä myös laskennalliset pitoisuudet olivat lähellä punnittuja



pitoisuuksia eikä hajontaa tuloksien välillä juuri ollut. Tämän lisäksi variaatiokertoimet pysyvät hyvin alhaisina, mikä kertoo siitä, että mittausten hajonta on vähäistä. Näin voidaankin todeta, että standardien osalta menetelmä on hyvinkin toistettava päivän sisällä.

Koska näytematriisilla todettiin olevan huomattavaa vaikutusta menetelmässä, oli hyvä tarkastella toistettavuutta myös näytteiden osalta. Kun samaa näyteliuosta injektointiin kahteen kertaan, voitiin tutkia saatujen tulosten samankaltaisuutta. Kuten taulukosta 11 huomataan, saatiin näytteillekin melko samanlaisia pinta-aloja ja pitoisuuksia toistettaessa injektio. Kuitenkin hajonnat ja variaatiokertoimet olivat suuremmat kuin standardinäytteiden. Vaikka tulokset olivat hyviä ja esimerkiksi variaatiokertoimet samassa linjassa Luonnonvarakeskuksen nestekromatografisen menetelmän variaatiokertoimien kanssa, huomaa tässä näytematriisin ja sitä kautta tulevien häiriötekijöiden vaikutuksen toistettavuuteen.

Jos toistettavuudella tutkitaan sitä, miten samankaltaisia tuloksia saatiin, kun olosuhteet pysyivät samana (analyysipäivän sisällä), niin eri analyysipäivinä tehtyjen toistojen avulla on tarkoitus tutkia tuloksien samankaltaisuutta muuttuvissa olosuhteissa eli analyysipäivien kesken. Standardien osalta tuloksia voidaan tutkia vertailemalla taulukon 10 standardituloksia eri päivinä. Päivien väliset standardipitoisuudet ja hajonnat eivät poikkea juurikaan toisistaan. Näytteiden osalta tuloksia on melko vähän, kun samaa Kingi-näytettä analysoitiin kahtena analyysipäivänä. Saadut kolekalsiferolipitoisuudet tälle näytteelle olivat molempina päivinä kuitenkin hyvin samat nimittäin 5,59 µg/100g ja 5,85 µg/100 g. Variaatiokertoimeksi saatiin 3,23, joka myös on melko pieni. Tällaisella erittäin pienellä tulosmäärällä voidaan olettaa uusittavuuden näytteiden kohdalla olevan myös kunnossa.

### 3.5.6 Saanto ja suhteelliset systemaattiset virheet

Molempien kirjolohiryhmien näytteistä tehtiin saantokoe. Sen avulla voidaan tutkia menetelmän suhteellista systemaattista virhettä. Virhettä voi aiheuttaa esikäsittelyn eri vaiheet sekä tietysti itse näytematriisi ja siinä olevat määrittämistä haittaavat yhdisteet. Rinnakkaisiin näytteisiin lisätiin tunnettu määrä analyyyttiä eli kolekalsiferolia (0,2 µg) ja näin pystyttiin laskemaan takaisinsaantoprosentit.

Taulukkoon 13 kerätyistä tuloksista ja erityisesti saaduista takaisinsaantoprosenteista huomataan, että menetelmän saanto oli melko huono. Yleensä takaisinsaantoprosentit ovat 60-90 %:n luokkaa (Ketola ym. 2012), mutta tällä menetelmällä saannoksi saatiin King-näytteille 60 % ja Verrokkikirjolohille vain 35 %. Tämä on esimerkiksi Luonnonvarakeskuksen käyttämään nestekromatografiseen menetelmään nähden huono saanto, sillä heidän takaisinsaantoprosenttinsa esimerkiksi näille kirjolohinäytteille oli yli 100 %:n luokkaa.

Jo rinnakkaisten vaihtelu sekä erityisesti sisäisen standardin määritettyjen pinta-alojen vaihtelu aiheutti epäilyksiä menetelmän toimivuudesta kirjolohinäytteille. Koska saantoihin aiheutuu useimmiten virheitä juuri näytemateriaalista johtuvien häiriötekijöiden takia, puoltaa näin matalat takaisinsaantoprosentit sitä ajatusta, että näytemateriaali heikentää menetelmän toimivuutta ja määritettävyyttä. Esikäsittelyä ja erityisesti uutena menetelmänä käytettyä SPE:tä olisi varmasti vielä syytä siis tarkastella sekä menetelmää kehittää, jotta varmistetaan parempi saanto ja luotettavammat tulokset.

### 3.5.7 Vertailumateriaalin soveltuvuus

Menetelmän kehityksen aivan loppuvaiheessa mukaan otettiin tutkittavaksi myös sertifioitu vertailumateriaali, CRM-122

margariininäyte. Margariinia punnittiin vain 5 g, vaikka sertifikaatissa ohjeistettiin näytekooksi vähintään 10 g. Tämä johtui siitä, että esikäsittely haluttiin saada mahdollisimman samanlaiseksi kuin kirjolohinäytteille. Vaikka koko esikäsittelyn liuosmäärät nelinkertaistettiin suuremman rasvapitoisuuden takia, oli näytteen määrittämisvaiheessa lopulta ongelmia, kun margariini-näyte ei kunnolla liuennut lopulliseen liuottimeen.

Määrittäsvaiheen haasteista huolimatta neljästä margariininäytteestä saatiin tuloksia, jotka on kerätty taulukkoon 14. Rinnakkaistulokset olivat linjassa ja lopulliseksi kolekalsiferolipitoisuuksien keskiarvoksi saatiin  $0,026 \pm 0,005$  mg/kg. Tämä kuitenkin poikkesi erittäin paljon vertailumateriaalin ilmoitetusta kolekalsiferolipitoisuudesta  $0,125 \pm 0,007$  mg/kg. Saadut tulokset olivat siis vain 21 % näytteen virallisesta kolekalsiferolipitoisuudesta. Joko tähänkin heijastuu esikäsittelyn ja menetelmän jatkokehittämisen tarve, jotta näytematriisi ei aiheuttaisi määrittäkselle niin suurta häiriötä tai sitten poikkeamat tuloksissa aiheuttaa näytemäärä, lopullisen näytteen liukenemisiongelmat ja mahdollinen liian heikko esikäsittely näin rasvaiselle näytteelle. Koska margariininäytteet otettiin mukaan vasta myöhäisessä vaiheessa tutkimusta, ei näille seikoille ollut mitään enää tehtävissä. Tuloksia tulee siis tulkita margariinien osalta hyvin harkiten eikä menetelmä sovellu sellaisenaan margariinille.

#### 4 Päätelmät

Kirjolohi sisältää vaihtelevia määriä kolekalsiferolia ja nämä pitoisuudet ovat pieniä. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli kehittää massaspektrometrinen menetelmä kirjolohen D-vitamiinipitoisuuksien määrittämiseen. Alun perin käytössä olleella QTOF-massa-analysaattorilla saatiin hyviä tuloksia D-vitamiiniyhdisteiden standardiliuoksille, mutta kirjolohen haastavalle näytematriisille sen herkkyys ei kuitenkaan riittänyt. Kun käyttöön otettiin

kolmoiskvadrupolimassa-analysaattori, saatiin huomattavasti parempi herkkyys ja erotettua kolekalsiferoli sekä sisäinen standardi, ergokalsiferoli, myös kirjolohinäytteistä. Näin ollen onnistuttiin kehittämään menetelmä kirjolohen D-vitamiinipitoisuuksien määrittelylle UHPLC-APCI-MS/MS -menetelmällä.

Kolmoiskvadrupolilla tehdyllä määrittelyllä saatiin erinomainen toistettavuus eikä tulosten välinen hajonta ollut suurta. Kirjolohinäytteiden rinnakkaisissa näytteissä oli kolekalsiferolipitoisuuksien osalta kuitenkin melko isoa vaihtelua. Sisäistä standardia oli myös lisätty kaikkiin näytteisiin saman verran, mutta silti ergokalsiferolille saaduissa pintaaloissa oli melkoisen paljon eroja. Lisäksi kahdelle näytteelle tehty saantokokeet antoivat erittäin matalia saantoprosentteja. Nämä kaikki viittaisivat siihen, että kirjolohi näytematriisina on sen verran haastava, että lisäkehitystyötä tulisi vielä tehdä esimerkiksi esikäsittelyvaiheisiin ja erityisesti uutena menetelmänä käyttöönotettuun SPE:hen, jotta varmistettaisiin näytteiden kunnollinen eluoituminen ja puhtaus niin, että näytemateriaalista tulevat häiriöt eivät vaikuttaisi määrittelyyn sekä varmistettaisiin paras mahdollinen saanto. Samassa yhteydessä tulisi tarkastella vielä vertailumateriaalivaihtoehtoja sekä varmistaa esikäsittelyn toimivuus myös vertailumateriaalille, jotta menetelmä saataisiin toimimaan myös vertailumateriaalille.

Kuitenkin kirjolohinäytteiden kolekalsiferolipitoisuudet saatiin määritettyä tällä kehitetyllä UPLC-APCI-MS/MS-menetelmällä. Toisena tutkimuksen tavoitteena olikin vertailla saman perimän omaavien kirjolohien kolekalsiferolipitoisuutta verrokkikirjolohiin, joissa perimässä on vaihtelua. Koska näytemäärä jäi tutkimuksessa melko pieneksi, on vaikeaa tehdä johtopäätöksiä perimän vaikutuksista kirjolohen D-vitamiinipitoisuuksiin. Kuitenkin vaihtelu kirjolohinäytteiden välillä voitiin huomata eikä kolekalsiferolipitoisuudet poikenneet ryhmien välillä juurikaan. Tilastollista eroa ei ryhmien välillä myöskään huomattu. Itse asiassa saman perimän omaavien kirjolohien kolekalsiferolipitoisuuksissa

oli hieman suurempi hajonta kuin näissä verrokkikirjolohissa. Tästä voidaan tehdä päätelmä, että perimällä ei ole vaikutusta kirjolohen kolekalsiferolipitoisuuksiin. Kuitenkin tuloksia tulisi saada vielä lisää, jotta voitaisiin tehdä lopullinen johtopäätös tästä.

## 5 Sisällysluettelo

Adamec, J., Jannasch, A., Huang, J., Hohman, E., Fleet, J.C., Peacock, M., Ferruzzi, M.G., Martin, B. & Weaver, C.M. 2011, Development and optimization of an LC-MS/MS-based method for simultaneous quantification of vitamin D2, vitamin D3, 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3, *Journal of separation science*, 34(1), s. 11-20.

Ball, G.F.M. 1996, Determination of the fat-soluble vitamins in foods by high-performance liquid chromatography, *Handbook of Food Analysis*, New York.

Bender, DA. 2003, *Nutritional Biochemistry of the Vitamins*. Cambridge University Press. 2:77-108.

Byrdwell, W.C. 2009, Comparison of analysis of vitamin D 3 in foods using ultraviolet and mass spectrometric detection, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), s. 2135-2146.

Byrdwell, W.C., Horst, R.L., Phillips, K.M., Holden, J.M., Patterson, K.Y., Harnly, J.M. & Exler, J. 2013, Vitamin D levels in fish and shellfish determined by liquid chromatography with ultraviolet detection and mass spectrometry, *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(2), s. 109-119.

Byrdwell, W.C., Devries, J., Exler, J., Harnly, J.M., Holden, J.M., Holick, M.F., Hollis, B.W., Horst, R.L., Lada, M., Lemar, L.E., Patterson, K.Y., Philips, K.M., Tarrago-Trani, M.T. & Wolf, W.R. 2008, Analyzing vitamin D in foods and supplements: methodologic challenges, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(2), s. 557S.

Cohen H, W.B. 1980, High pressure liquid chromatographic determination of Vitamin D3 in instant nonfat dried milk, *J. Assoc. Off. Anal. Chem*, 70, s. 802-805.

Duaví W. Vieira G, Guedes, J, Melo D, Cavalcante R, Nascimento R. 2017, Insights about Advances in Chromatographic Analysis in Complex Environmental Analytical Matrices, .

Eitenmiller R, Ye L, Landen Jr W 1944, Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences , 2. p., CRC Press Taylor Francis Grop, USA.

Faktor J, Dvorakova M, Maryas J, Procházková I, Bouchal P. 2012, Identification and characterisation of pro-metastatic targets, pathways and molecular complexes using a toolbox of proteomic technologies, *Klinická onkologie : casopis České a Slovenské onkologické společnosti*, 2, s. 7.

Fritz, C.A., Navetta, K.A., Wolford, D.P. & Colangelo, J.L. 2017, Assessment of endogenous 25-hydroxyvitamin D serum concentrations by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in various animal species, *Veterinary Clinical Pathology*, 46(2), s. 371-379.

Geib, T., Sleno, L., Hall, R.A., Stokes, C.S. & Volmer, D.A. 2016, Triple Quadrupole Versus High Resolution Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry for Quantitative LC-MS/MS Analysis of 25-Hydroxyvitamin D in Human Serum, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 27(8), s. 1404-1410.

Gerald F, C.J. 1992, The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health , 5. p., Academic Press Limited, Lontoo, Iso-Britannia.

Gill, B.D. & Indyk, H.E. 2018, Analysis of Vitamin D2 and Vitamin D3 in Infant and Adult Nutritional Formulas by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: A Multilaboratory Testing Study, *Journal of AOAC International*, 101(1), s. 256-263. DOI 10.5740/jaoacint.17-0149.

Gill, B.D., Zhu, X. & Indyk, H.E. 2015, A rapid method for the determination of vitamin D3 in milk and infant formula by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of AOAC International*, 98(2), s. 431-435.

Hoffmann E. Stroobant V 2001, Mass Spectrometry Principles and Applications, Wiley.

Holick, M.F. 2003, Vitamin D: A millenium perspective, *Journal of Cellular Biochemistry*, 88(2), s. 296-307.

Honour, J. 2003, Benchtop mass spectrometry in clinical biochemistry. *Annals of clinical biochemistry*, 40, s. 628-38.

Huang, M., LaLuzerne, P., Winters, D. & Sullivan, D. 2009, Measurement of vitamin D in foods and nutritional supplements by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of AOAC International*, 92(5), s. 1327-1335.

Jakobsen, J., Clausen, I., Leth, T. & Ovesen, L. 2004, A new method for the determination of vitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in meat.

Ketola R, Kostiainen R, Kotiaho T, Vainiotalo P 2012, *Massaspektrometrian perusteet*, 2. p., Hakapaino, Helsinki.

Lamberg-Allardt, C. 2006, Vitamin D in foods and as supplements, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 92(1), s. 33-38.

LOCK, E.-., WAAGBØ, R., WENDELAAR BONGA, S. & FLIK, G. 2010, The significance of vitamin D for fish: a review, *Aquaculture Nutrition*, 16(1), s. 100-116.

Makin H.L.J., Trafford D. J. H. (toim.) 1984, *Measurement of Vitamin D and its Metabolites by Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, Springer, Boston, USA.

Mattila, P. 1995, *Analysis of cholecalciferol, ergocalciferol and their 25-hydroxylated metabolites in food by HPLC*, Väitöskirja. p., EKT-sarja 995. Helsingin yliopisto. Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos, Helsinki.

Mattila, P., Piironen, V., Haapala, R., Hirvi, T. & Uusi-Rauva, E. 1997, Possible Factors Responsible for the High Variation in the Cholecalciferol Contents of Fish, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), s. 3891-3896.

Miller BE, N.A. 1984, *Handbook of vitamins. Nutritional, biochemical and clinical aspects*, Marcel Dekker Inc, New York, USA.



Muniz JF, Wehr CT ja Wehr HM 1982, Reverse phase liquid chromatographic determination of vitamins D2 and D3 in milk, Journal Association of Official Analytical Chemists, 65, s. 791-797.

Ostermeyer, U. & Schmidt, T. 2006, Vitamin D and provitamin D in fish, European Food Research and Technology = Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung.A, 222(3-4), s. 403-413.

Parrish, D.B. & Richter, E.F. 1979, Determination of vitamin d in foods: A review, C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 12(1), s. 29-57.

Pérez Fernández, V., Ventura, S., Tomai, P., Curini, R. & Gentili, A. 2017, Determination of target fat-soluble micronutrients in rainbow trout's muscle and liver tissues by liquid chromatography with diode array-tandem mass spectrometry detection, Electrophoresis, 38(6), s. 886-896.

Phillips, K.M., Pehrsson, P.R. & Patterson, K.Y. 2018, Survey of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D in traditional native Alaskan meats, fish, and oils, Journal of Food Composition and Analysis, 74, s. 114-128.

Phillips, K.M., Craig Byrdwell, W., Exler, J., Harnly, J.M., Holden, J.M., Holick, M.F., Hollis, B.W., Horst, R.L., Lemar, L.E., Patterson, K.Y., Tarrago-Trani, M.T. & Wolf, W.R. 2008, Development and validation of control materials for the measurement of vitamin D3 in selected US foods.

Pierens, S.L. & Fraser, D.R. 2015, The origin and metabolism of vitamin D in rainbow trout.

Thompson BM ja Cressey PJ 2014, Determination of vitamin D in foods: current knowledge and data gaps, Ministry for Primary Industries, 3, s. 1-39.

Trenerry, V.C., Plozza, T., Caridi, D. & Murphy, S. 2011, The determination of vitamin D3 in bovine milk by liquid chromatography mass spectrometry.

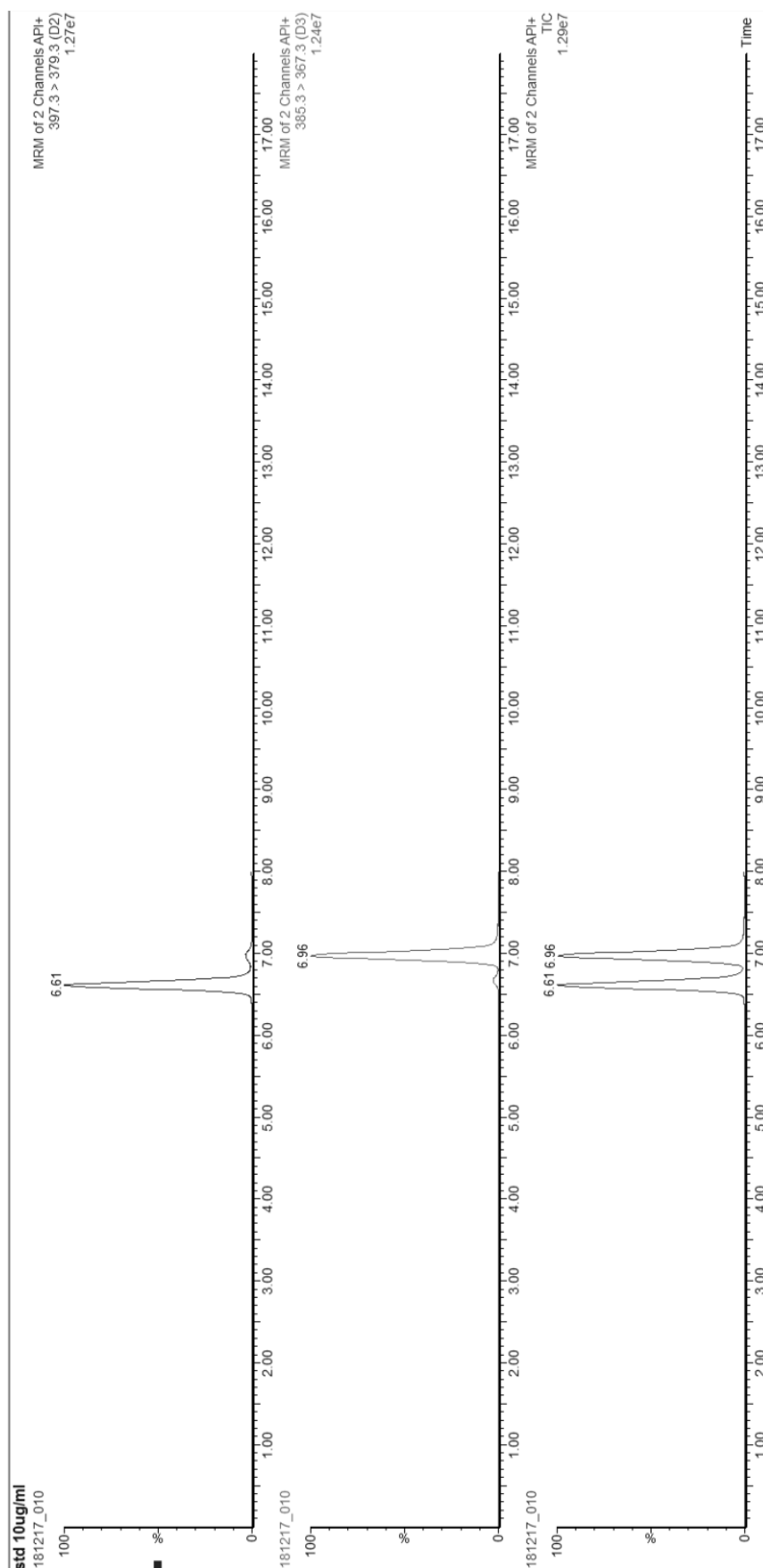
Webb AR ja Holick MF 1988, The role of sunlight in the cutaneous production of vitamin D3, Ann. Rev. Nutr, 8, s. 375-399.

Zhang, H., Quan, L., Pei, P., Lin, Y., Feng, C., Guan, H., Wang, F., Zhang, T., Wu, J. & Huo, J. 2018, Simultaneous determination of Vitamin A, 25-hydroxyl vitamin D3 a-tocopherol in small biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1079, s. 1-8.

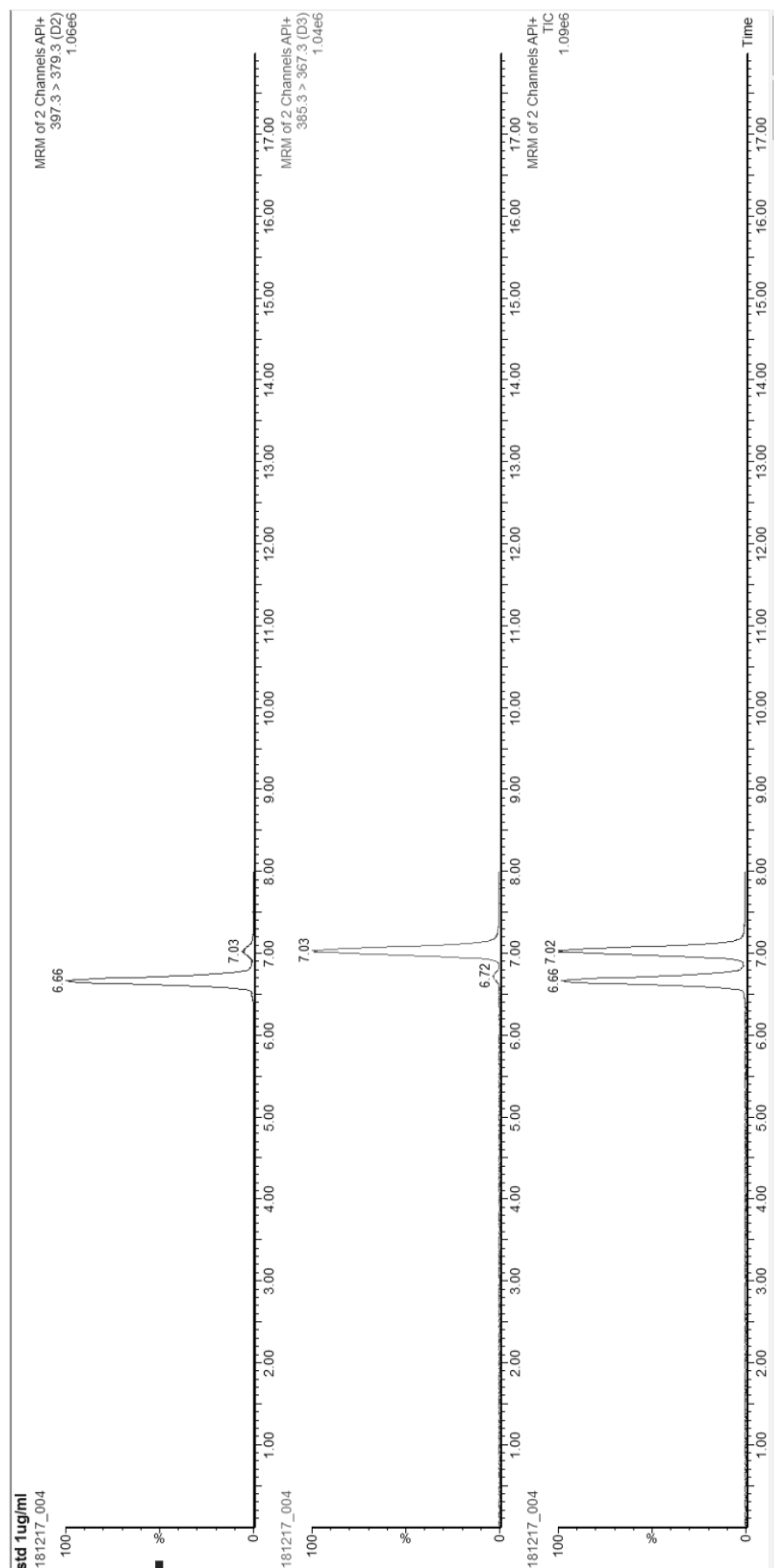
Zhou B, Xiao JF, Tuli L and Ransom HW 2012, LC-MS-based metabolomics *Mol. BioSyst*, 3, s. 470–481.

Terveyttä ruoasta – Suomalaiset ravitsemussuosituksset 2014

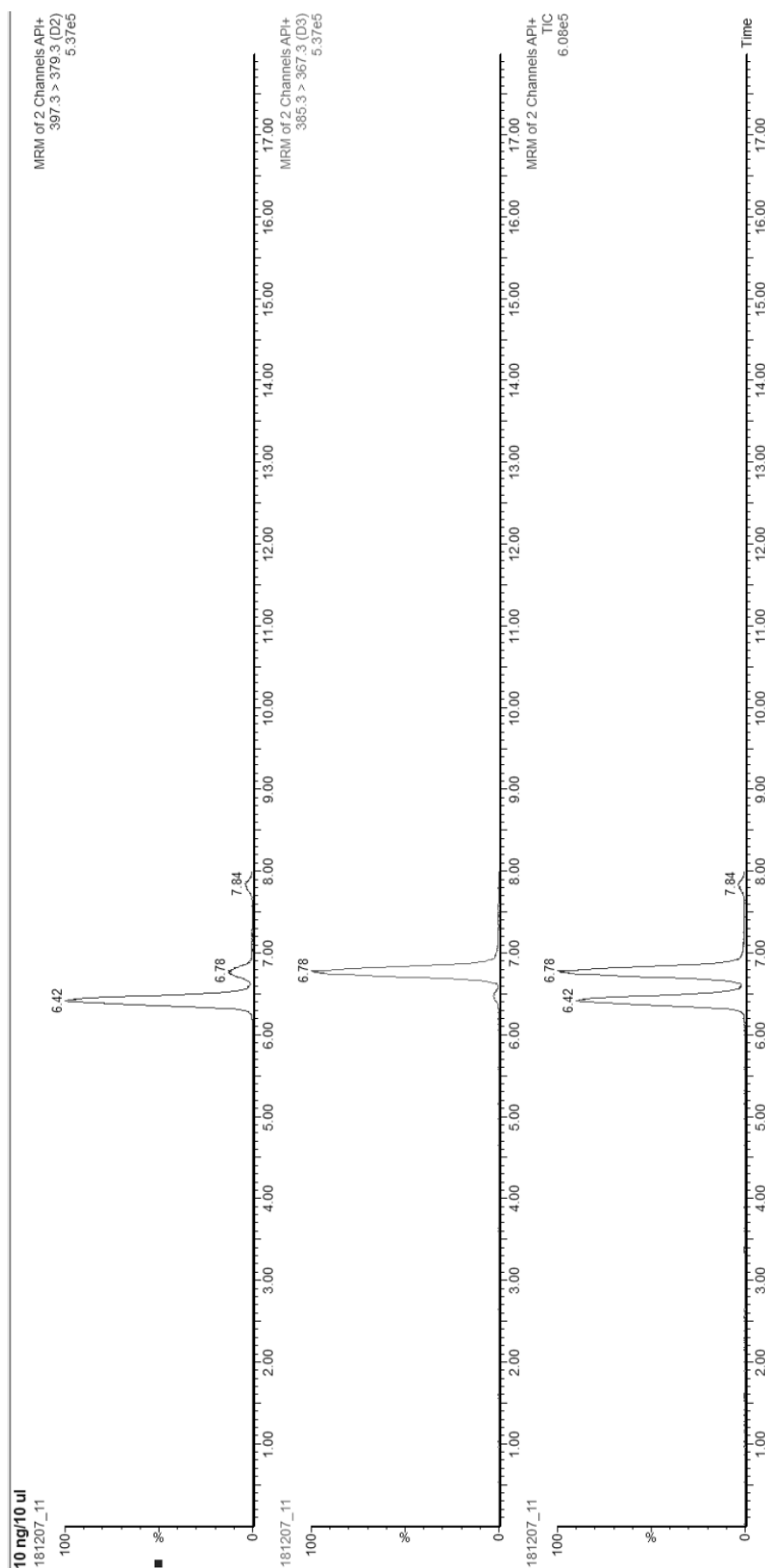
Liite 1. Kole- ja ergokalsiferolin veden lohkeaminen standardiliuoksesta, kun pitoisuus oli 10 µg/ml



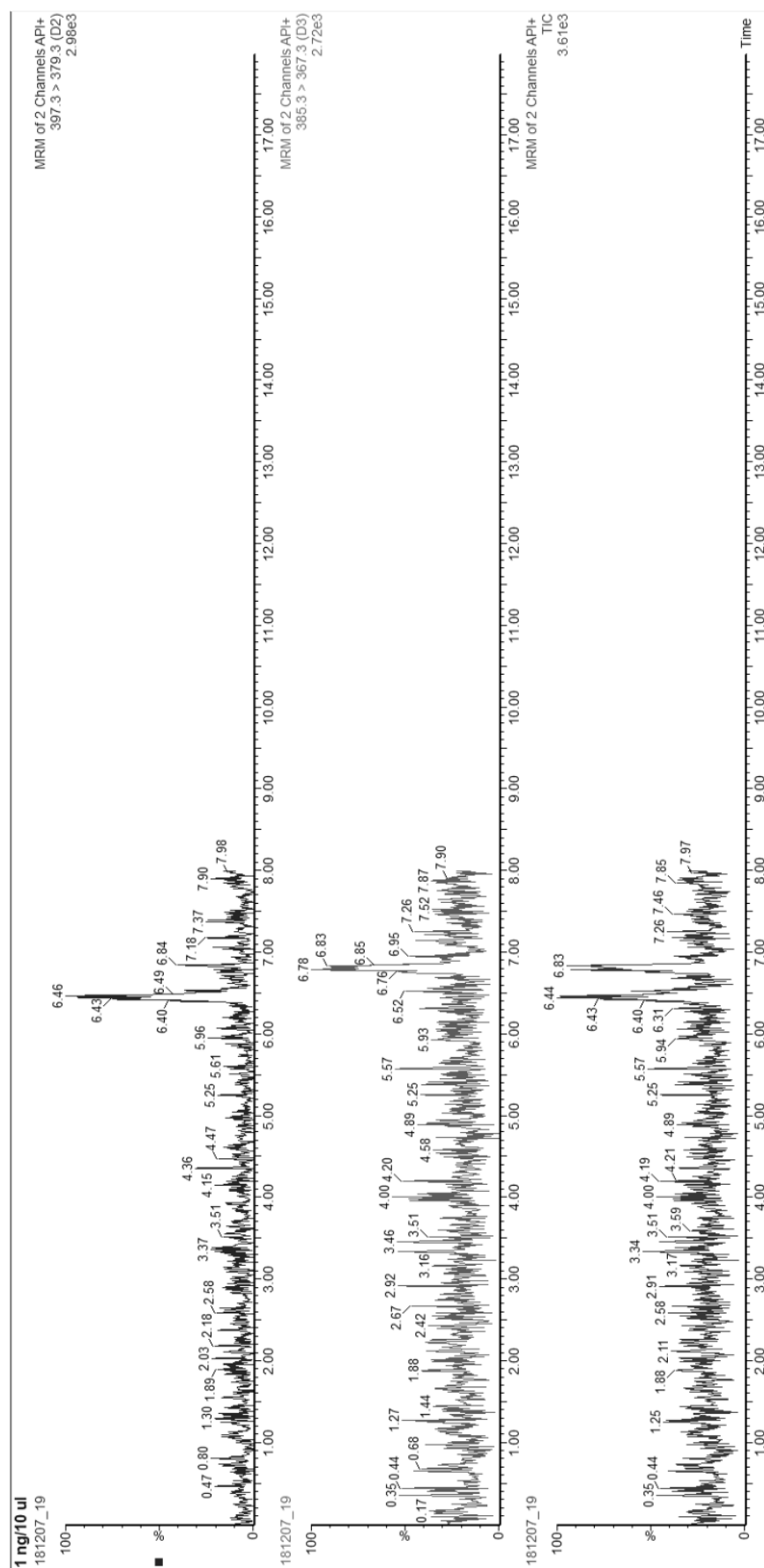
Liite 2. Kole- ja ergokalsiferolin veden lohkeaminen standardiliuoksesta, kun pitoisuus oli 1 µg/ml



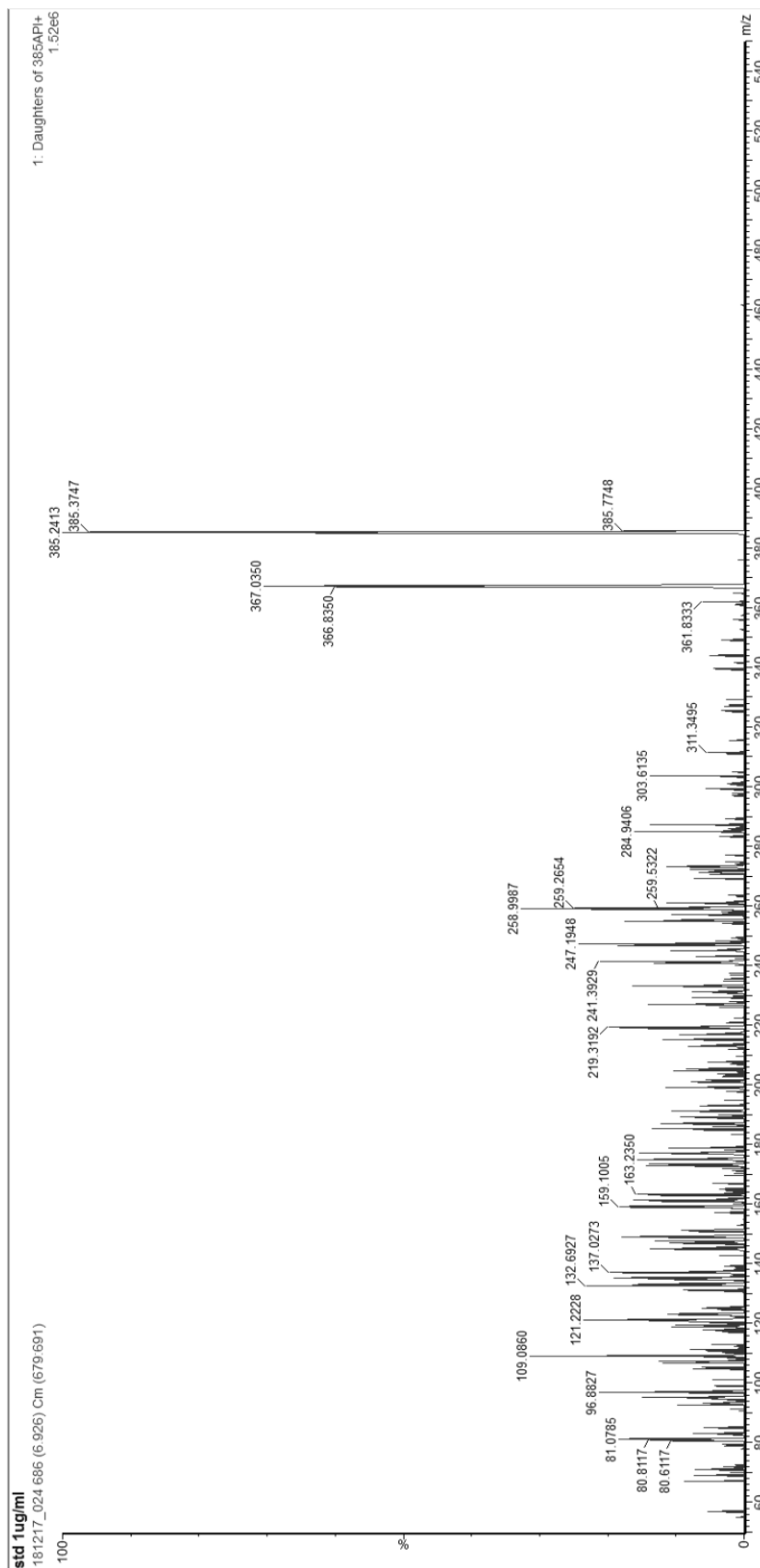
Liite 3. Veden lohkeaminen standardinäytteestä, jossa pitoisuus 10 ng 10µl injektiossa



Liite 4. Veden lohkeaminen standardinäytteestä, jossa pitoisuus 1 ng 10 $\mu$ l injektiossa



Liite 5. Kolekalsiferolin massaspektri 1 µg/ml standardikantaliuoksesta



Liite 6. MRM-menetelmän kromatogrammit 1 µg/ml standardiliuksella

